



DEPARTAMENTO DE FÍSICA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

ANÁLISE DE UM MARCADOR PERIFÉRICO
PARA AS ALTERAÇÕES MUSCULARES
ESQUELÉTICAS INDUZIDAS PELO EXERCÍCIO
AERÓBIO

João Miguel Costa Baio
Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica
Universidade de Coimbra

2009



DEPARTAMENTO DE FÍSICA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**ANÁLISE DE UM MARCADOR PERIFÉRICO
PARA AS ALTERAÇÕES MUSCULARES
ESQUELÉTICAS INDUZIDAS PELO EXERCÍCIO
AERÓBIO**

João Miguel Costa Baio
Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica
Universidade de Coimbra

2009

Universidade de Coimbra

**ANÁLISE DE UM MARCADOR PERIFÉRICO
PARA AS ALTERAÇÕES MUSCULARES
ESQUELÉTICAS INDUZIDAS PELO EXERCÍCIO
AERÓBIO**

Tese de Mestrado em Engenharia Biomédica

Executada na Faculdade de Desporto e Educação Física e na Faculdade de Medicina da
Universidade de Coimbra

Orientadores:

Professora Doutora Paula Cristina V B Tavares

Professor Doutor C A Fontes Ribeiro

O projecto onde se insere esta tese foi parcialmente financiado pela FCT

Dissertação apresentada ao Departamento de Física da Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade de Coimbra para obtenção do Mestrado Integrado em
Engenharia Biomédica

Coimbra – Portugal

2009

Agradecimentos

À Professora Doutora Paula Tavares por toda a ajuda e apoio dado durante a realização deste trabalho e também pela confiança em mim depositada na decisão de ceder o Laboratório de Fisiologia do Músculo para a realização das experiências deste trabalho.

Ao Professor Doutor Fontes Ribeiro pela disponibilidade prestada.

Ao Professor Doutor Miguel Morgado por toda a ajuda desde o momento em que foi meu professor e pelo apoio dado ao longo deste ano de projecto.

À colega de trabalho Lúcia, com quem partilhei a fase inicial no treino dos animais, e a qual me aturou e me ensinou muito sobre todos os procedimentos para usar um laboratório e que sempre esteve disponível para ajudar.

Aos meus pais pelo constante amor incondicional que sempre me levou a superar todos os dissabores.

A todos os meus amigos que me acompanharam ao longo deste tempo de aprendizagem e os quais me apoiaram sempre que foi necessário.

Abstract

This thesis aims to establish a relationship between the morphologic changes that occur in the skeletal muscle (changes in muscular fibers type I and type II) and the expression of two isoforms of the nitric oxide synthase (NOS), the iNOS and the cNOS, in blood platelets, after exercise, in order to use the values of this expression in platelets as a peripheral marker of the changes induced in the muscle tissue.

To verify the possibility of this relationship, we have used two groups of male Wistar rats in an eight week exercise protocol. The first group, control one, stayed in the cages, only doing every other day slight walks on the treadmill, so that their muscles didn't atrophied and by using the treadmill itself they maintain the same psycho-motor characteristics as the exercise group. The second group, the exercise one, has performed a treadmill training protocol with the duration of eight weeks with a progressive speed and slope.

Our exercise protocol induced the changes we needed since only in the exercise group the relative percentage of muscle fibers changed, namely in the soleus muscle, whose type I muscle fibers increased. The changes in the type II muscle fibers were not significant, namely in the gastrocnemius muscle, a representative muscle of this type of muscle fibers.

Concerning the expression of the two isoforms of NOS, we can conclude that the aerobic exercise performed has increased the expression of both isoforms in the soleus muscle and in platelets. Thus, the expression increment of the cNOS and iNOS seems to be related with the increase of muscle fibers type I.

In conclusion, our results suggest that platelet NOS may be a peripheral marker of the exercise-induced aerobic changes in muscle. Therefore, platelets may replace the need of a muscular biopsy, making easier the monitoring of training.

Keywords: soleus muscle, gastrocnemius muscle, muscle fiber type I, muscle fiber type II, NOS, iNOS, cNOS, aerobic training.

Resumo

Neste trabalho procurámos estabelecer uma relação entre as alterações morfológicas que ocorrem nos tecidos musculares esqueléticos após o treino aeróbio (alteração da sua composição a nível de fibras musculares tipo I e tipo II), e a expressão de duas isoformas da óxido nítrico sintetase (NOS), a iNOS e a cNOS, nas fibras musculares e nas plaquetas sanguíneas, de forma a se poder tomar os valores desta última expressão como um marcador periférico para essas mesmas alterações musculares.

Para determinar a possibilidade de se estabelecer essa relação, usámos dois grupos de ratos Wistar machos num protocolo de treino de oito semanas. O primeiro grupo, grupo controlo, permaneceu nas gaiolas, fazendo apenas uma ligeira caminhada em dias alternados, por forma a não ficarem com os músculos atrofiados e se poderem adaptar ao tapete rolante, mantendo também as mesmas características psico-motoras que os ratos exercitados. O segundo grupo, grupo de exercício, realizou um protocolo de treino que consistiu em corrida ao longo do período de treino com velocidade e inclinação crescentes consoante a evolução temporal, de acordo com o protocolo da secção de metodologia.

Verificámos que o protocolo a que sujeitámos os ratos criou de facto as alterações morfológicas que pretendíamos: alteração da percentagem relativa de fibras tanto no músculo gastrocnemius como no músculo solear, músculos com tipo predominante de fibras musculares do tipo II e tipo I, respectivamente. Houve um aumento significativo de fibras musculares do tipo I no músculo solear.

Relativamente à expressão das duas isoformas da NOS podemos concluir que o exercício aeróbio aumenta a expressão de ambas as isoformas no músculo solear e nas plaquetas. Assim, o aumento da expressão da cNOS e iNOS no músculo parece associar-se ao aumento das fibras musculares do tipo I.

Em conclusão, os nossos resultados sugerem que poderemos tomar as plaquetas sanguíneas como um marcador periférico para atestar as alterações morfológicas sofridas nos músculos esqueléticos em resposta a um treino programado, nomeadamente

as alterações morfológicas das fibras musculares do tipo I, tornando mais fácil a monitorização do treino aeróbio, já que não serão necessárias biópsias musculares.

Palavras-chave: músculo solear, músculo gastrocnemius, fibra muscular tipo I, fibra muscular tipo II, NOS, iNOS, cNOS, treino aeróbio.

Índice

1. Introdução	1
1.1. Enquadramento do estudo	1
1.2. O estado da Arte	2
1.2.1. Músculo Esquelético Estriado	2
1.2.2. Fibras Musculares e Exercício	7
1.2.3. Distribuição do tipo de fibras musculares pelos músculos esqueléticos	10
1.2.4. O Uso de Biopsias em Atletas	11
1.2.5. Óxido Nítrico Sintetase e as suas Isoformas	12
1.1.5.1. cNOS	14
1.1.5.2. iNOS	15
1.1.5.3. Expressão de NOS no Músculo Esquelético	15
1.1.5.4. Expressão de NOS nas Plaquetas	16
1.1.5.5. A Técnica de Western Blot	17
1.1.6. O Modelo Animal do Rato	17
1.1.6.1. Vantagens do Uso de Animais de Pequeno Porte	17
1.1.6.2. Porquê usar o rato?	19
2. Objectivos	20
3. Metodologia	21
3.1. Caracterização dos Animais em Estudo	21
3.2. Treino do Animais	21
3.1.1. Protocolo de Treino	22
3.2. Avaliação do Efeito do Treino	23
3.3. Amostras Sanguíneas	24
3.4. Sacrifício dos Animais e Extracção dos Músculos	25
3.5. Western Blot	25
3.6. Análise Histológica	30
3.7. Análise Estatística	30

4.	Resultados	32
4.1.	Evolução do peso, da velocidade e do tempo de corrida com o treino	32
4.2.	Quantificação percentual das fibras musculares nos dois músculos	35
4.3.	Expressão das isoformas cNOS e iNOS nos dois músculos e nas plaquetas	37
5.	Discussão	39
6.	Conclusão	44
7.	Bibliografia	46

Índice de Figuras

Figura 1. Organização do músculo esquelético desde o seu nível macroscópico ao molecular. F, G, H e I são cortes transversais nos níveis indicados. (Bloom e Fawcett , 1986).----- 3

Figura 2. A: a molécula de miosina. B: a combinação de muitas moléculas de miosina para formar um filamento de miosina. Também são mostradas as pontes cruzadas e a interacção entre as cabeças das pontes cruzadas e os filamentos adjacentes de actina (Guyton e Hall, 2006).----- 4

Figura 3. O filamento de actina formado por duas cadeias helicoidais de actina-F e por moléculas de tropomiosina. Existe um complexo de troponina, preso a uma das extremidades de cada molécula de tropomiosina, que desencadeia a contracção (Guyton e Hall ,2006).----- 4

Figura 4. Mecanismo “sempre em frente” para a contracção muscular (Guyton e Hall, 2006).----- 5

Figura 5. Estados relaxado e contraído de uma miofibrilha mostrando o deslizamento dos filamentos de actina (traços pretos ligados aos discos Z) nos espaços entre os filamentos de miosina (traços a preto negrito com traços transversais) (Guyton e Hall, 2006).----- 5

Índice de Tabelas

Tabela I. Algumas características dos diferentes tipos de fibras musculares(McComas, 1996)..----- 6

Tabela II. Algumas características das duas isoformas de NOS em estudo (Arnold et al., 1977; Bredt e Snyder, 1994; Davis et al., 2001; Förstermann et al., 2001).----- 14

Tabela III. Protocolo do treino de oito semanas a que foram sujeitos os animais de exercício.----- 23

Tabela IV. Dados da performance das velocidades e tempos de corrida no teste de velocidade do nosso estudo.----- 35

Tabela V. Dados da performance das velocidades e tempos de corrida no teste de velocidade no artigo de Lambert et al. (1996).-----40

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Pesos dos animais em estudo.-----	32
Gráfico 2. Tempo de duração do teste de velocidade/resistência, em minutos.-----	33
Gráfico 3. Velocidade máxima atingida (cm.s^{-1}) durante o teste de velocidade/resistência.-----	34
Gráfico 4. Percentagem relativa das fibras musculares esqueléticas tipo I e tipo II no músculo solear dos ratos em estudo (controlo vs exercício).-----	36
Gráfico 5. Percentagem relativa das fibras musculares esqueléticas tipo I e tipo II no músculo gastrocnemius lateral dos ratos em estudo (controlo vs exercício).-----	36
Gráfico 6. Densidade relativa (%) da expressão da cNOS nos dois músculos em estudo e nas plaquetas.-----	37
Gráfico 7. Densidade relativa (%) da expressão da iNOS nos dois músculos em estudo e nas plaquetas.-----	38

1. Introdução

1.1. Enquadramento do estudo

Os grandes avanços do desporto conduziram a abordagens de treino que cada vez mais incluem as avaliações fisiológicas.

As características musculares dos atletas bem como a sua evolução com o treino é habitualmente realizada com recursos a biopsias de músculo, às quais, sob o ponto de vista ético e técnica coloca-nos algumas restrições. Neste sentido, métodos e técnicas alternativas às biopsias musculares são objectivo da nossa equipa de trabalho. No presente estudo tentaremos demonstrar a utilização de um marcador periférico para o referido propósito.

No sentido de melhor compreendermos os objectivos deste trabalho bem como o seu desenvolvimento faremos uma revisão do estado da arte onde começaremos por introduzir alguns conceitos da fisiologia da contracção muscular e da caracterização e acção das fibras musculares. Abordaremos ainda o óxido nítrico (NO) e as enzimas responsáveis pela sua produção por serem o alvo principal da nossa investigação laboratorial.

Iremos descrever a metodologia usada que utilizámos para realizar este estudo, desde a caracterização dos animais e seu treino, á extracção de amostras e às técnicas histoquímicas usadas para analisar os tecidos musculares e as plaquetas.

Sendo que caso fosse possível trocar a comum técnica de biopsia muscular pelo método que pretendemos testar, seria um avanço bastante benéfico principalmente para o sujeito em teste e abriria novas portas na compreensão do funcionamento do músculo esquelético e a sua interacção com o restante organismo.

1.2. O estado da Arte

1.2.1. Músculo Estriado Esquelético

O músculo esquelético é uma forma de tecido muscular estriado que está sob o controlo do sistema nervoso somático. É um dos três tipos de músculos existentes, sendo os outros dois, o músculo liso e o músculo cardíaco. A denominação de esquelético provém do facto deste tipo de músculo estar ligado ao tecido ósseo através de fibras de colagénio, os tendões. Chama-se estriado por apresentar estrias quando observado ao microscópio electrónico, como veremos adiante.

O músculo esquelético é constituído por fascículos musculares, sendo que depois estes são constituídos por componentes individuais chamadas de fibras musculares. Estas fibras são compridas, cilíndricas, e multinucleadas. Cada fibra muscular é de facto uma célula muscular. Estas células são constituídas por miofibrilhas que contêm na sua constituição os filamentos responsáveis pela contracção, sendo eles o filamento de actina e o filamento de miosina. As proteínas de contracção encontram-se agrupadas em pequenos sistemas denominados sarcómeros. O sarcómero é a unidade funcional básica desta célula, responsável pelo aspecto estriado que esta forma de músculo tem e de onde vem o seu nome e pelo mecanismo que permite a estas fibras executarem a contracção muscular, este estriamento deve-se às fronteiras de cada sarcómero, á qual se chama disco Z, sendo que ao longo de uma miofibrilha existem imensos sarcómeros, divididos entre si por estes discos Z. Os discos Z além de manterem a estabilidade do sarcómero a nível longitudinal na miofibrilha, ordena também todas as miofibrilhas adjacentes a esta, estando todos os discos Z ligados entre si, vindo daí a estriação que é criada pelo padrão de [disco Z – filamento de actina – filamento de miosina – filamento de actina – disco Z], como é bem explícito na Figura 1. O nome músculo é dado ao conjunto de feixes fascículos musculares agregados por tecido conjuntivo (McComas, 1996).

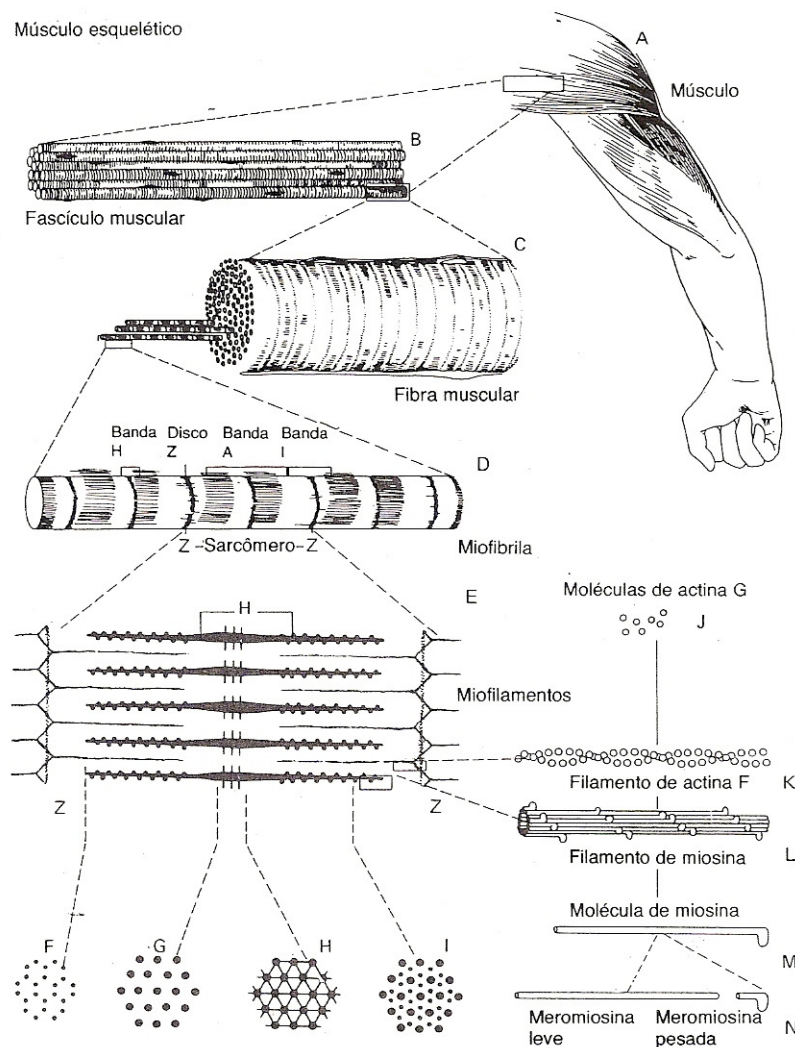


Figura 1. Organização do músculo esquelético desde o seu nível macroscópico ao molecular. F, G, H e I são cortes transversais nos níveis indicados. (Bloom e Fawcett , 1986).

Em termos embriológicos cada fibra muscular é formada pela fusão de células indiferenciadas imaturas em desenvolvimento chamadas de mioblastos que se irão transformar nas longas, cilíndricas e multinucleadas células musculares. O seu desenvolvimento primário está completo por altura do nascimento do ser vivo, porém ao longo da vida, as fibras continuam a crescer em comprimento e diâmetro.

A miosina, designado por filamento grosso, é composto por moléculas polissacarídeas de miosina, que estão ligadas e enroladas em hélice, sendo que as são as

suas terminações, denominadas de pontes cruzadas, como mostra a Figura 2A, que irão interagir com o filamento de actina e provocar a contracção, como mostra a Figura 2B.

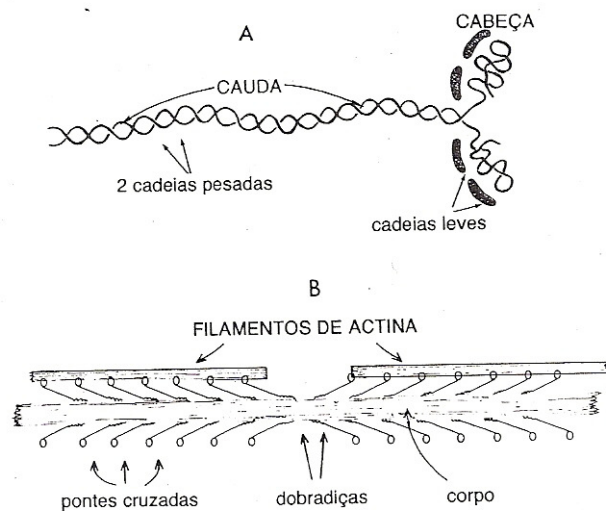


Figura 2. A: a molécula de miosina. B: a combinação de muitas moléculas de miosina para formar um filamento de miosina. Também são mostradas as pontes cruzadas e a interacção entre as cabeças das pontes cruzadas e os filamentos adjacentes de actina (Guyton e Hall, 2006).

A actina, designada por filamento fino, é composta por um complexo proteico que contém moléculas de actina, de tropomiosina e de troponina (Figura 3).

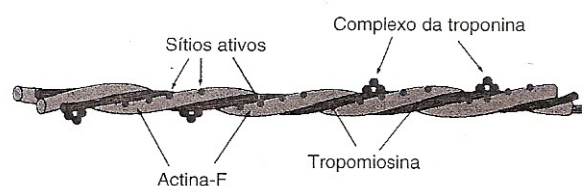


Figura 3. O filamento de actina formado por duas cadeias helicoidais de actina-F e por moléculas de tropomiosina. Existe um complexo de troponina, preso a uma das extremidades de cada molécula de tropomiosina, que desencadeia a contracção (Guyton e Hall, 2006).

No filamento de actina existem locais onde as pontes cruzadas do filamento de miosina vão-se ligar, esses locais são activados quando a tropomiosina, as destapa. A tropomiosina está ligada á actina através do complexo de troponina, que quando

activada faz deslocar a tropomiosina sobre a actina, destapando os locais de ligação (sítios activos) às pontes cruzadas da miosina, podendo estas interagir com eles, fazendo deslocar o filamento de actina, no chamado mecanismo “sempre em frente” (Figura 4).

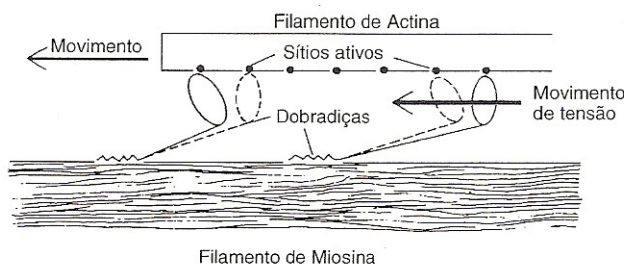


Figura 4. Mecanismo “sempre em frente” para a contração muscular (Guyton e Hall, 2006).

Essa movimentação da troponina ocorre por um aumento da concentração de iões de cálcio no meio celular, que provêm do retículo sarcoplasmático que os armazena sempre que o músculo está em repouso e não necessita de contração. Essa libertação de cálcio por parte do retículo sarcoplasmático é controlado previamente por potenciais eléctricos provenientes dos neurónios motores. Quando esse local é destapado, a interacção com as pontes cruzadas do filamento de miosina ocorre, levando a que o filamento de actina se desloque em direcção ao centro do sarcómero, encurtando-o dessa maneira, dando então origem à contração muscular (Figura 5).

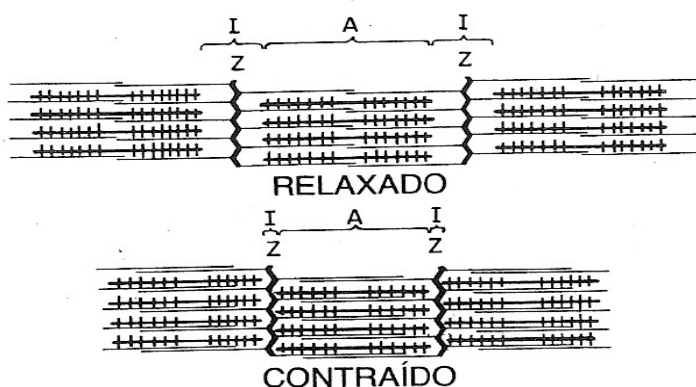


Figura 5. Estados relaxado e contraído de uma miofibrilha mostrando o deslizamento dos filamentos de actina (traços pretos ligados aos discos Z) nos espaços entre os filamentos de miosina (traços a preto negrito com traços transversais) (Guyton e Hall, 2006).

As fibras musculares estão divididas em duas categorias, tipo I e tipo II, sendo que dentro do tipo II existem alguns subgrupos. Esta diferenciação por tipo dá-se devido ao tipo de miosina presente nessa fibra (rápida ou lenta) e à capacidade de fosforilação oxidativa que essa fibra é capaz.

As fibras do tipo I, ou fibras lentas, têm uma coloração vermelha devido à presença de oxigênio ligado à proteína de mioglobina. Este tipo de fibra é mais resistente à fadiga, logo especialista em exercícios de maior duração onde a resistência seja crucial, porque usam o metabolismo oxidativo para gerar ATP.

As fibras do tipo II, têm coloração branca com pouca quantidade de mioglobina, tendo em substituição enzimas glicolíticas. Este tipo de fibras tem uma ação mais explosiva, ou seja, são mais eficientes para picos de grande velocidade e força mas de curta duração, logo fatigam muito rapidamente. Estas fibras usam tanto o metabolismo oxidativo como também o anaeróbio, dependendo do seu subtipo.

Tabela I. Algumas características dos diferentes tipos de fibras musculares. (McComas, 1996)

Tipo de fibra	Tipo I	Tipo II
Tempo de contracção	Lento (110 ms)	Muito Rápido (50 ms)
Tamanho do neurónio motor	Pequeno	Muito Grande
Fibras por neurónio motor	10-180	300-800
Resistência á fadiga	Alta	Baixa
Tipo de actividade	Aeróbia	Anaeróbia de curta duração
Tempo máximo de uso	Horas	< 1 minuto
Força produzida	Baixa	Muito Alta
Densidade de mitocôndrias	Alta	Baixa
Densidade capilar	Alta	Baixa
Capacidade oxidativa	Alta	Baixa
Capacidade glicolítica	Baixa	Alta
Principal fonte de energia	Triglicerídeos	Fosfato de creatina, glicogénio
Gene humano da cadeia de miosina	MYH7	MYH4
Músculo em análise	Solear	Gastrocnemius

1.2.2. Fibras Musculares e Exercício

A sobrecarga funcional induzida pelo exercício físico promove o aumento da tensão muscular e a produção de energia tornando o músculo esquelético susceptível a alterações (Armstrong et al, 1991; Takekura e tal, 2001).

Durante as fases mais adiantadas do exercício, uma adaptação notável é a hipertrofia das fibras musculares (Wernig, 2003; Argaw, 2004), por exemplo, como aquelas que ocorrem no músculo vastos de indivíduos submetidos a um treino de resistência e força (Jackson et al, 1990). Uma das formas de se estudar as alterações das fibras musculares, como a hipertrofia, é por meio da medição das dimensões geométricas (Altman e Bland, 1999) das secções transversais das fibras. Técnica similar também tem sido utilizada no estudo da detecção de células cancerígenas (Heckman e Jamasbi, 1999) e das características morfofuncionais das fibras do músculo esquelético de espécies animais.

Nos estudos morfométricos do tecido muscular são frequentemente avaliadas as dimensões geométricas dos cortes transversais das fibras como os diâmetros ortogonais, o perímetro da secção e a área (Edstrom e Nystrom, 1969. Mattiello-Sver et al, 2005). Um dos métodos usados na análise quantitativa da fibra é a mensuração do seu menor diâmetro como proposto por Dubowitz (1973). Esta metodologia tem sido amplamente utilizada na avaliação da hipertrofia induzida pelo exercício físico e nos processos atróficos induzidos pelo desuso ou desnervação (Mattiello-Sver et al, 2005). O estudo da geometria dos cortes transversais de fibras musculares como proposta por Dubowitz (1973) tem sido realizado através de retículos de oculares e com o uso de desenhos em câmaras claras acoplados a um microscópio óptico.

A percentagem das fibras musculares que compõem um músculo será a mesma durante toda a vida de um indivíduo? A resposta é não. O tecido muscular esquelético tem a capacidade de se adaptar consoante os estímulos a que é sujeito, e essa adaptação também é notória na variação do tipo de fibras musculares que constituem o músculo. Sendo que um músculo se pode tornar “mais lento” ou “mais rápido”, ou seja, maioritariamente constituído por fibras do tipo I ou tipo II, respectivamente, consoante a demanda funcional a que é sujeito, ou seja, o fenótipo da fibra muscular pode ser alterado conforme o estímulo recebido.

A alteração da incidência do tipo de fibras musculares que compõem determinado músculo pode ocorrer, como por exemplo, devido a alterações na cadeia pesada de miosina (MHC), que por sua vez altera o tipo histoquímico da fibra muscular em questão, ou também devido à atrofia de determinada unidade motora (Pette e Staron, 1997. Lieber, 2002. Scott, 2001).

A alteração do tipo de fibra muscular dá-se pela transformação de miofibrilhas de um tipo com determinado diâmetro noutra de maior ou menor diâmetro, consoante o dependendo do inicial. Se for realizado um treino de exercícios explosivos, o músculo tende a converter as suas fibras do tipo I em fibras do tipo II. Isso acontece através de um processo de apoptose, com o qual acontece a eliminação de miofibrilhas de pequeno diâmetro, no lugar destas, e com origem numa célula satélite irá gerar-se uma nova miofibrilha com um diâmetro superior, e assim ocorrendo em geral ao longo de toda a fibra muscular, levando assim à sua transformação de fibra de tipo I em fibra de tipo II. O contrário também acontece, sendo que a eliminação de uma miofibrilha de grande diâmetro, irá ser substituída por várias de menor diâmetro, também a partir de células satélite, e em resposta a um tipo de treino de resistência.

Vários factores podem ser responsáveis por alterações do tipo de fibras musculares. Podemos ter alterações devido a alterações de estímulos funcionais, como a variação da distribuição do tipo de fibras musculares em condições de baixa gravidade, tornando as fibras lentas em rápidas (Staron et al., 1998), situações em que os indivíduos têm alguma lesão medular ou são submetidos a uma imobilização também sofrerão alterações do mesmo tipo (Lieber, 2002). Estes resultados mostram que quando os músculos são sujeitos a não utilização dos mesmos, estes têm tendência a apresentar maior número de fibras rápidas. No sentido contrário, quando o músculo é sujeito a actividades de carga ou existe um aumento da actividade neuromuscular as fibras têm tendência a tornarem-se de rápidas para lentas, como acontece em estudos com electroestimulação crónica, hipertrofia ou alongamentos (Staron e tal., 1998. Lieber, 2002).

Outros factores que interferem na alteração do tipo de fibras são o envelhecimento (Pette e Satron, 2001), os níveis hormonais (Iannuzo et al., 1994. Lomax e Roberstson, 1992). Os exercícios podem ser divididos naqueles que aumentam a resistência á fadiga, nos aumentam a velocidade e a força muscular. Está bem

estudado que a realização de treino em que é há grande estímulo metabólico tem como consequência um aumento da capacidade oxidativa das fibras, ocorrendo transformação de fibras rápidas em lentas (Fitts e Widrick, 1996.). Sendo que estas alterações de fibras rápidas em lentas, ocorrem maioritariamente dentro do género das fibras tipo II, ou seja, transformação de fibras do tipo IIb em IIa. Sendo que com o aumentar da intensidade do treino, pode ocorrer a transformação da fibra de tipo II em tipo I (Pette e Satron, 2001).

O tecido muscular esquelético apresenta uma grande susceptibilidade a lesões devido á sua intensa solicitação durante o quotidiano dos indivíduos. O potencial regenerativo deste tecido apresenta três fases nesse processo de regeneração muscular (Carlson e Faulknet, 1983. Jarvinen e tal., 2005):

1. Fase de destruição: caracterizada pela ruptura e necrose das fibras, formação de hematoma entre as fibras rompidas e reacção inflamatória.
2. Fase de reparação: caracterizada pela fagocitose do tecido necrosado, regeneração de fibras, produção de tecido conjuntivo cicatricial e neovascularização dentro da área lesada.
3. Fase de remodelação: período no qual ocorre maturação das fibras regeneradas, contracção e reorganização do tecido cicatricial e recuperação da capacidade funcional do músculo.

A remoção do tecido necrosado e dos produtos da lise celular do foco de lesão constitui um factor determinante no processo de regeneração muscular. A retirada destes detritos é realizada pelos macrófagos e leucócitos polimorfonucleares através da fagocitose (Collins, 2000).

Na fase intermediária do processo de regeneração ocorre a activação, determinação, proliferação e diferenciação das células satélites, encarregadas de restaurar, parcial ou totalmente, as fibras lesadas. Entre os sinais biológicos directamente relacionados com a regulação da actividade dessas células podemos citar as citocinas, factores neurotróficos e demais factores de crescimento libertados durante o processo inflamatório inicial (Grounds, 1991; Hurme e Kalimo, 1992; Rende et al., 2000; Tidball, 2005). Tais substâncias são capazes de estimular, ou inibir, a proliferação celular assim como influenciar o seu processo de citodiferenciação. São produzidos

localmente no sítio de lesão e actuam de forma autócrina e/ou parácrina via receptores encontrados na superfície da membrana celular (Grounds, 1991).

1.2.3. Distribuição do tipo de fibras musculares pelos músculos esqueléticos

Os músculos esqueléticos podem ser divididos em classes consoante as características histoquímicas e bioquímicas das fibras musculares que os constituem. Historicamente, as fibras musculares foram classificadas pelas já referidas fibras de tipo I (lentas) e fibras de tipo II (rápidas) (Powers e Howley, 2000). Sendo que actualmente também já existam estudos que demonstrem a existência de 7 tipos de fibras musculares, os tipos I, Ic, IIa, IIb, IIc e IIac (Fry et al, 2003).

Tem sido demonstrado que atletas de estilos desportistas diferentes também apresentam diferenças percentuais no tipo de fibras musculares dos seus músculos esqueléticos. Enquanto que os velocistas e culturistas possuem uma predominância de fibras musculares do tipo II, por outro lado fundistas e atletas de desportos de resistência apresentam o inverso, ou seja, uma predominância de fibras do tipo I. Pode-se explicar então que consoante o tipo de exercício e o tipo de músculos mais solicitados durante certo tipo de exercício, ora esse organismo tem tendência a transformar um músculo esquelético com maior tendência de fibras tipo I ou de tipo II (Portal e tal, 2004).

Sendo o músculo gastrocnemius um músculo com preponderância para realizar contracções mais explosivas, ele é um exemplo de um músculo com fibras musculares do tipo II, e sendo o músculo solear um músculo com bastante mais resistência á fadiga, sendo um músculo que utilização mais duradoura, é um exemplo de um músculo com fibras musculares do tipo I (Portal e tal, 2004).

1.2.4. O uso de biopsias em atletas

A biopsia muscular é um processo de extrema importância na avaliação de uma lesão neuromuscular num paciente, sendo na maioria dos casos fulcral para a determinação de uma miopatia. Para além de ser indispensável para a avaliação de doenças musculares, é muitas vezes indicada quando á suspeita de doenças neuropáticas, particularmente na distinção de uma desordem neurogenética atípica de uma miopatia antecessora. No caso do nosso estudo, ela também é usada para recolher o tecido muscular de modo a podermos avaliar as alterações fisiológicas decorrentes do tipo de treino executado.

O procedimento cirúrgico para obter uma amostra de tecido muscular é relativamente simples porém implica alguns riscos para o paciente, sendo uma técnica muito sensível, deve ser realizada correctamente de forma a otimizar a informação recolhida e a não prejudicar o paciente, de forma a minimizar o incómodo que este irá sentir no músculo de onde se extrair a amostra (Lomax e Roberstson, 1992).

A biopsia muscular de hoje em dia, pode parecer um procedimento muito agressivo, porém antes do método que hoje em dia é usado, ela era bastante mais penosa para o paciente. Era necessário uma pequena cirurgia exposta, na qual e após o corte de algumas camadas superficiais de tecidos era retirada uma amostra de tecido muscular. A biopsia muscular de hoje em dia, auxilia-se de uma seringa oca com uma lâmina no seu interior. Primeiramente o local á superfície onde se vai extrair a amostra de tecido é anestesiado, seguida depois de um pequeno corte, suficiente para a seringa poder entrar nos tecidos superficiais. Depois a seringa perfura os tecidos até ao tecido muscular pretendido, onde quando em contacto com este, a pessoa que está a realizar a biopsia faz deslizar a lâmina que está no interior da seringa, cortando então um pedaço de tecido que ficará no interior da seringa (a parte oca desta). A seringa é posteriormente retirada e a amostra que está no seu interior, pesando algumas gramas, é retirada dela, limpa do sangue, montada e rapidamente congelada, para poder ser depois cortada em lascas e ser observada em microscópio^[1].

É devido á lesão que esta biopsia provoca que estamos interessados em testar um outro procedimento que não seja tão invasivo como o da biopsia e do qual se obtenham informações fidedignas sobre as alterações e/ou adaptações sofridas no tecido muscular.

Sendo que esse novo procedimento que pretendemos testar se baseia na comparação da expressão de duas isoformas da enzima sintetase de óxido nítrico (NOS, na nomenclatura inglesa) que estão presentes no tecido muscular bem como num constituinte sanguíneo, as plaquetas.

1.2.5. Óxido nítrico sintetase e as suas isoformas

A enzima óxido nítrico sintetase (NOS, na nomenclatura inglesa) produz óxido nítrico (NO, na nomenclatura inglesa) a partir do aminoácido L-arginina. Necessitando da presença de dois cofactores, o oxigénio e o fosfato dinucleótido adenina nicotinamida (NADPH, na nomenclatura inglesa). Sendo que o processo de formação de NO a partir da L-arginina, não é exclusivo do NO, ou seja, a partir da L-arginina pode-se formar NO e L-citrulina, sendo que depois tanto o NO se pode converter em L-citrulina como o contrário também pode ocorrer, dependendo das condições a que o organismo esteja sujeito.

Óxido nítrico ou monóxido de azoto (ou de nitrogénio) é um gás com fórmula química NO, é uma molécula simples, constituída por um átomo de oxigénio ligado a um átomo de azoto (nitrogénio), o que torna a sua estrutura química fácil de estudar com grande detalhe. Este composto químico é uma importante molécula de sinalização ou “mensageiro molecular” nos mamíferos, que está envolvido em diversos processos fisiológicos e patológicos, benéficos e prejudiciais (Hou et al., 1999).

As suas implicações fisiológicas são cada vez mais estudadas e vão desde a regulação do fluxo sanguíneo, adesão plaquetelar, agregação neutrófila, ligações sinápticas (Feldman et al., 1993; Gally et al., 1990; Moncada e tal., 1991), sendo a molécula de óxido nítrico um radical livre, o que é relevante para se compreender a sua alta reactividade.

Na década de 1980, foi descoberto que o NO servia como mediador da actividade citotóxica de macrófagos contra microrganismos e células neoplásicas (Hibbs et al., 1988).

O óxido nítrico (NO) não deve ser confundido com Óxido Nitroso (N₂O), que é um anestésico e um dos gases do “efeito de estufa” nem com Dióxido de nitrogênio (NO₂) que é também um gás poluidor.

Apesar de ser uma molécula simples, o NO é um composto fulcral nos campos das neurociências, fisiologia e imunologia e foi-lhe atribuído no ano de 1992 o título de Molécula do Ano pela Science, foi fundada a Nitric Oxide Society, sendo que em 1998, o Prémio Nobel em Fisiologia/Medicina foi atribuído a Robert Furchgott, Louis Ignarro e Ferid Murad pela descoberta do papel das propriedades sinalizadoras do óxido nítrico no sistema cardiovascular.. Estima-se que cerca de 3000 artigos científicos são publicados por ano sobre o papel fisiológico do óxido nítrico^[2].

O NO é produzido por uma ampla variedade de tipos celulares que incluem células epiteliais, nervosas, endoteliais e inflamatórias (Tylor et al, 1997) que contêm a NOS para produzir NO.

Existem três isoformas de NOS, duas denominadas constitutivas e dependentes do cálcio, que são a endotelial (cNOS) e a neuronal (nNOS), as quais sintetizam NO em condições normais, e a indutível e independente de cálcio (iNOS), que se expressa em muita pouca quantidade em condições fisiológicas (Majano et al, 2001).

As 2 isoformas constitutivas são a constitutiva neuronal (NOS1) e a constitutiva endotelial (NOS3), a isoforma indutiva tem a denominação de NOS2, denominação esta que é dada pela diferenciação entre elas consoante um gene que difere entre elas (Gilkeson et al, 1997).

Para o nosso estudo apenas nos interessam as isoformas NOS2 e NOS3, pois a NOS1 esta relacionada com o sistema nervoso, que neste caso não nos interessa.

Estas duas isoformas de NOS estão classificadas da seguinte forma:

Tabela II. Algumas características das duas isoformas de NOS em estudo (Arnold et al., 1977; Bredt e Snyder, 1994; Davis et al., 2001; Förstermann et al., 2001).

Nome	NOS2	NOS3
Outros nomes	iNOS (NOS indutível)	cNOS (NOS constitutiva) eNOS (NOS endotelial)
Tamanho do monómero	~131 kDa	~133 kDa
Tecidos	Macrófagos, coração, fígado, músculo liso, endotélio	Endotélio, cérebro, epitélio
Funções	Antimicrobial, citotóxica, inflamação, choque séptico	Relaxamento vascular (vasodilatação), diminuição da adesão plaquetelar, agregação, angiogénese
Alguns inibidores	Aminoguanina, S-benzillisotioureia, 1-(2-trifluormetilfenil)imidazol, L-n ⁶ -(1-iminoetil)lisina	N-metil-L-arginina, N-nitro-L-arginina, N-iminoetil-L-ornitina, 7-nitroindazol
Cofactores	NADPH, FMN, FAD, H4 biopterina, Calmodulina, Heme	NADPH, FMN, FAD, H4 biopterina, Calmodulina, Heme

1.2.5.1. cNOS

NOS endotelial (eNOS), também denominado por óxido nítrico sintetase 3 (NOS3) ou NOS constitutivo (cNOS), forma NO nos vasos sanguíneos e está envolvido na regulação do funcionamento do sistema vascular, nomeadamente com o fluxo sanguíneo, através da vasodilatação dos vasos. O eNOS está associado á membrana plasmática e á membrana do complexo de Golgi (Shaul, 2002; Duda e tal., 2004).

1.2.5.2. iNOS

Diferindo das isoformas dependentes de cálcio (nNOS e cNOS), a iNOS é caracterizada por ser insensível ao cálcio, possivelmente devido á ligação forte não covalente entre a calmodolina (CaM) e o ião Ca^{2+} .

De um ponto de vista funcional, é de ressaltar que a indução de uma grande produção de iNOS ocorre perante um meio oxidativo, fazendo assim com que elevadas concentrações de NO tenham a possibilidade de reagir com o superóxido levado à formação de peroxinitritos que causam toxicidade celular.

Estas propriedades podem caracterizar a função da iNOS na imunidade do organismo hospedeiro, permitindo a sua participação em processos anti-microbiais e anti-tumorais como parte da acção oxidativa dos macrófagos (Mungrue et al., 2002).

1.2.5.3. Expressão de NOS no músculo esquelético

A localização precisa das 3 isoformas da NOS no musculo esquelético de seres humanos ainda não está confirmada na sua totalidade, porque o NO é um radical livre de curta duração, ou seja, a sua acção está limitada á vizinhança onde este é produzido, logo o estabelecimento da localização celular precisa das isoformas NOS poderá vir a dar um grande contributo para a determinação do NO no músculo esquelético humano (Frandsen et al., 1996).

No músculo esquelético esta provado que o NO sintetizado a partir do endotélio vascular contribui para a regulação do fluxo sanguíneo e também que a formação de NO no músculo esquelético inibe o consumo de oxigénio por parte das mitocôndrias através de uma reacção com a citocromo oxidase (Vallance e tal., 1989; Shen et al., 1995).

O tipo endotelial, NOS3, está provado que se pode encontrar no endotélio vascular, no citoplasma de fibras ricas em mitocôndrias e mitocôndrias da músculo (Kobzik et al., 1995; Bates et al., 1996).

Para avaliarmos a expressão das duas isoformas de NOS nos músculos, precisamos de identificar estas isoformas por si só, ou seja, não nos serve determinar a

expressão que estas isoformas têm na informação genética do organismo. Sabemos que todos os constituintes do organismo estão expressos no DNA como um manual de substâncias a produzir pelo organismo. Estando no DNA essa informação, ela é extraída do núcleo pelo mRNA, que por sua vez a irá levar a enzimas próprias que irão produzir as proteínas em questão, neste caso as duas isoformas da NOS, a NOS2 e a NOS3. A nós o que nos interessa é a expressão da proteína em si, ou seja, a expressão que as isoformas têm nos músculos que estudamos e nas fibras musculares nas quais as queremos identificar, mais propriamente nas fibras musculares do tipo I e tipo II. Para determinar essa expressão, tanto nos músculos como nas plaquetas iremos usar o método de Western Blot, que um pouco mais á frente abordaremos.

Visto existirem duas diferenciações entre fibras musculares, nomeadamente, tipo I e tipo II, iremos analisar duas amostras de músculo. Para a fibra do tipo I iremos analisar tecido muscular do músculo solear. Para o tipo de fibra do tipo II iremos analisar tecido muscular do músculo gastrocnemios.

1.2.5.4. Expressão de NOS nas plaquetas

Estudos sobre o papel do NO e da activação guanilciclase presente nas plaquetas remonta já há mais de trinta anos. O NO está relacionado com a estimulação da guanil ciclase solúvel e aumenta os níveis de cGMP, o que inibe a função plaquetelar (Mellion e tal., 1981) . É sabido que dois importantes agonistas na agregação plaquetelar, a trombina e o colagénio, provocam um aumento rápido nos níveis cGMP plaquetelar (Chiang e tal., 1975; Barber, 1976). Radomski et al., 1990, registaram a actividade da cNOS no citoplasma plaquetelar e a medição da produção de NO por plaquetas intactas também foi directamente obtida (Pronai e tal., 1991; Malinski e tal., 1993), contudo não conseguiram descobrir quais das isoformas estavam presentes nas mesmas medições.

Porém no estudo de Sase e Michel, 1995, com o intuito de se determinar as isoformas da NOS presentes nas plaquetas, foi determinado a presença da isoforma cNOS, sendo que a sua função lá ainda não esteja totalmente esclarecida.

1.2.5.5. A técnica de Western Blot

Western blot, ou “imunoblot proteico”, é uma técnica analítica usada para detectar proteínas específicas numa amostra de homogenato (células trituradas) ou extracto de tecido biológico.

Primeiramente é executado um gel de electroforese sobre a amostra, que separa ou desnatura as proteínas consoante o tamanho do seu polipeptídeo (condições de desnaturação) ou pela estrutura 3D da proteína (condições de não-desnaturação). Depois as proteínas são transferidas para uma membrana, tipicamente de nitrocelulose ou PVDF, onde elas são detectadas usando anticorpos específicos consoante as proteínas que se pretendam identificar (Towbin et al., 1979; Renart et al., 1979). Podendo-se com este processo examinar a quantidade de determinada proteína numa dada amostra e comparar com os valores de outras amostras.

O método teve origem no laboratório de George Stark em Stanford e o nome de Western Blot foi dado por W. Neal Burnette (Burnette, 1981) e é um trocadilho com o nome do método Southern Blot, uma técnica usada para a detecção de ADN desenvolvida por Edwin Southern. Existem também outros 2 métodos similares, o Northern Blot (detecção de ARN) e o Eastern Blot (detecção de modificações pós-translacionais na proteína).

O método de Western Blot é usado nas áreas da biologia molecular, bioquímica, genética, entre outros onde se pretendam correlacionar quantificações de proteínas.

1.2.6. O modelo animal do rato

1.2.6.1. Vantagens do uso de animais de pequeno porte

O rato é o organismo modelo mais relacionado com o ser humano. Os genomas do rato e do ser humano são aproximadamente do mesmo tamanho, contém o mesmo número de genes e partilham a mesma ordem de genes. A maioria dos genes humanos

são homólogos aos do rato e têm funcionalidades semelhantes. As mutações que causam doenças nos humanos, na maioria dos casos também as causa nos ratos. Mas mais importante, o rato tem genes que não estão presentes noutros dos grandes modelos animais (a mosca da fruta e a minhoca nematóide), os genes do sistema imunitário.

As semelhanças acima referidas provavelmente aplicam-se a muitos mamíferos, porém o rato tem outras propriedades que o tornam único. Os ratos são pequenos, fáceis de manter em laboratório e comparados com a maioria dos mamíferos tem um curto ciclo reprodutivo (cerca de 2 meses). As mutações podem-lhes ser induzidas facilmente, quer através de radiações, alimentação com químicos mutagénicos ou inserindo fragmentos de ADN no seu genoma de forma a interromper os genes.

A escolha dos ratos para análises genéticas é também suportada pelo facto de existirem diferentes raças, tais como a *Mus musculus* e *Mus spretus*, que podem ser usadas para cruzamento. A vantagem desta abordagem reside no facto destas diferentes raças terem diferentes sequências de ADN, o que quando cruzadas, dão híbridos heterogéneos o que irá proporcionar a criação de mapas genéticos extensivos. Cruzamentos em grande escala podem ser usados para encontrar genes relacionados com doenças com alguma precisão, porque é muito mais rápido mapear o gene de uma doença no rato e depois usar a sua localização para a posicionar no equivalente do que fazer o mapeamento do genoma humano directamente. Estratégias avançadas de reprodução podem ser usadas para criar estirpes, tais como congénitas, que possam ser geneticamente semelhantes com a excepção de algum gene que se pretenda.

Como se não bastassem as características acima referidas, o rato tem uma vantagem tecnológica. A transferência de genes está bastante desenvolvida nos ratos em geral, e o rato transgénico pode ser criado incorporando um qualquer gene de interesse sendo também o único vertebrado em que gene pré-selecionados podem ser deliberadamente mutados, os chamados knock-out mice. Isto quer dizer que é possível criar réplicas dos defeitos genéticos que causam as doenças nos humanos.

Por razões ainda desconhecidas, algumas doenças complexas são difíceis de replicar para o rato e nesses casos usa-se o rato comum como alternativa.

1.2.6.2. Porquê usar o rato?

O uso dos ratos como principal modelo animal para estudos humanos tem quatro principais razões de ser:

1. A já referida manipulação genética. O que elimina parcialmente as diferenças fenotípicas que poderiam ser derivadas das genotípicas. No caso do ser humano é praticamente impossível fazer-se essa manipulação a todos os seres estudados, ou seja, seria demasiado dispendioso.
2. A possibilidade de controlar o meio ambiente. Sem um controlo eficaz sobre as variáveis ambientais que actuam sobre o organismo, seria muito difícil estudá-lo pois haveria sempre alguma variável que poderia escapar. Ou seja não seria possível colocar um certo número de seres humanos numa divisão controlada hermeticamente a fim de realizar a experiência. Ser possível, seria, mas não seria ético, seria bastante mais dispendioso e seria difícil encontrar indivíduos dispostos a tal sem qualquer recompensa.
3. O acompanhamento do historial do sujeito em análise. O historial de todas as experiências por que passou tal sujeito tem um papel importante no comportamento desse organismo na actualidade. No caso do rato, é fácil ao investigador acompanhar toda a vida do rato desde que nasce até à experiência. Ora, no ser humano seria bastante mais complicado. Ou se faria algo completamente inético, acompanhar um ser humano desde a sua nascença e mantê-lo totalmente controlado ou então através de entrevistas, documentação, investigações, etc., coisa que não teria a riqueza e exactidão de detalhes que se podem obter do rato.

Os ratos são mamíferos e dóceis. Vivem o tempo suficiente para que possam participar nas experiências mais longas, são de dimensão reduzida de fácil manuseamento e trato, de manutenção relativamente barata e reproduzem-se rápida e facilmente num biotério.

2. Objectivos

No contexto desportivo actual, a biopsia muscular é usada como um dos métodos de avaliação da constituição muscular do atleta e como ela reage perante situações diversas como o overtraining, altitude, profundidade e outras. Tal procedimento além de ser doloroso, restringe o atleta a uma pausa forçada para recuperação do mesmo procedimento. Esta biopsia muscular é executada com o objectivo de encontrar in loco (tecido muscular) o objecto em estudo, quer seja por alteração do tipo de fibras musculares ou adaptações a situações particulares do treino e/ou competição. A biopsia é, actualmente, o método mais eficaz, apesar de todos os malefícios e considerações éticas e/ou técnicas que possam envolver.

Tendo por premissas a necessidade de analisar o tecido muscular do atleta sem recurso a biopsias (demasiado invasivas) pretendemos encontrar um marcador periférico (nas células sanguíneas) que possa reproduzir alterações musculares esqueléticas.

As plaquetas, contrariamente a outras células do organismo humano, expressam as duas isoformas da enzima produtora de óxido nítrico, a sintetase do óxido nítrico (NOS). Essas isoformas, uma constitutiva (cNOS) e outra indutível (iNOS), expressam-se no músculo esquelético em relação directa com o tipo de fibra muscular (tipo I ou tipo II).

Assim, é objectivo deste trabalho testar as seguintes hipótese:

- Qual o efeito do exercício aeróbio na expressão das isoformas da NOS nas plaquetas e no músculo esquelético.
- Se a expressão das isoformas da NOS nas fibras do músculo esquelético são semelhantes e proporcionais à expressão encontrada nas plaquetas;

3. Metodologia

3.1. Caracterização dos animais em estudo

Utilizaram-se ratos Wistar adultos jovens, que começaram com cerca de 8 semanas e pesos entre 249g e 300g. O grupo de exercício era constituído por seis animais e o grupo de controlo por cinco, num total de 11 animais.

Os ratos foram mantidos em condições controladas, com uma temperatura de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, humidade de 50-60% e um ciclo de luz/escuridão de 50/50%. Os ratos foram mantidos dentro de gaiolas apropriadas para o seu tamanho, em cada uma colocaram-se 2 ratos. Os animais tiveram acesso a comida e água *ad libitum*,

Antes de dar-mos início á fase de treinos registámos o peso, com o recurso a uma balança digital KERN & Sohn GmbH, Germany, modelo CB 6 K I, dos ratos para mais tarde avaliar-mos da evolução destes com o regime de treino a que foram submetidos.

3.2. Treino dos animais

Todos os ratos, quer em regime de treino de exercício quer os de controlo, tiveram uma sessão inicial de habituação ao tapete rolante que foi usado para realizar os exercícios, que consistiu em caminharem durante 5 minutos a $10,2\text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ ($6\text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$).

Em relação ao treino propriamente dito, o exercício realizado pelos ratos, consistiu por parte dos ratos de controlo numa caminhada de 8 minutos á velocidade de $1,02\text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$, 3 vezes por semana, durante 8 semanas, de forma a eles terem algum grau de familiarização com o tapete, visto que no fim da fase de treinos se iria realizar um teste de velocidade máxima, na qual eles também iriam ser testados.

Quanto aos ratos de exercício, o exercício consistiu em corrida aeróbia durante todos os dias úteis da semana, durante 8 semanas. O treino dos ratos exercitados foi um

treino evolutivo, em que com o passar dos treinos, a velocidade de corrida, tempo de corrida e a inclinação do tapete rolante foram aumentando, segundo um protocolo descrito pormenorizadamente no ponto Protocolo de Treino.

O equipamento usado para o exercício foi um tapete rolante da empresa Panlab SL, modelo LE 8700 Treadmill Control.

Este instrumento é de fácil manejo, tendo como funcionalidades o controlo da velocidade instantânea do tapete, dando também para variar a inclinação do mesmo. O tapete tem a característica que “ajuda” os ratos a não parar de correr devido á preguiça, que se baseia no facto de ter uma grelha na qual circula uma corrente variável entre 0 mA e 10 mA (a intensidade destes choques também pode ser controlada instantaneamente por um controlo na interface do instrumento) que se encontra localizada no fundo do tapete, e que quando os ratos se deixam seguir parados no tapete vão de encontro a esta grelha, o que lhes fará apanhar um choque, e na maioria dos casos reagir e regressar a correr para o tapete.

Este instrumento está informaticamente ligado a um computador que com o software específico instalado (SeDaCom 32, Letica's device), regista todos os dados do treino (tempo de treino, velocidade do tapete, número de choques apanhado nesse intervalo de tempo, duração total do somatório dos choques apanhados nesse intervalo de tempo).

3.2.1. Protocolo de treino

O treino aeróbio foi seguido segundo um protocolo previamente estabelecido.

Os ratos exercitados realizaram exercício todos os dias da semana (5 vezes por semana) durante as 8 semanas de treino.

Resumo do protocolo de treino aeróbio dos ratos exercitados em passadeira:

Tabela III. Protocolo do treino de oito semanas a que foram sujeitos os animais de exercício.

Semana de Treino	Velocidade Máxima (cm.s ⁻¹)	Tempo à Velocidade Máxima	Tempo da Sessão (minutos)	Inclinação da passadeira
1 ^a	15 (25,5 m.min ⁻¹)	10 min.	12	0 %
2 ^a	20 (34 m.min ⁻¹)	12 min.	14	0 %
3 ^a	35 (59,5 m.min ⁻¹)	15 min.	20	0 %
4 ^a	50 (85 m.min ⁻¹)	5 min.	35	0 %
5 ^a	50 (85 m.min ⁻¹)	10 min.	40	0 %
6 ^a	54 (91,8 m.min ⁻¹)	30 min.	50	15%
7 ^a	54 (91,8 m.min ⁻¹)	50 min.	52	15%
8 ^a	54 (91,8 m.min ⁻¹)	50 min.	52	15%

Os ratos de controlo foram sujeitos a exercício 3 vezes por semana (às 2^a feiras, 4^a feiras e 6^a feiras), que consistiu em andar na passadeira durante 8 minutos á velocidade de 10,2 m.min⁻¹, durante as 8 semanas de treino, por forma a estarem nas mesmas condições psico-motoras que os animais de exercício para que os resultados possam ser comparados correctamente.

3.3. Avaliação do efeito do treino

Por forma a avaliarmos o efeito que o treino teve na condição física dos ratos, realizámos o chamado teste de velocidade máxima que foi realizado para todos os ratos e com a passadeira com inclinação de 5%, começando com um aquecimento durante 4 minutos a uma velocidade de 10,2 m.min⁻¹ (6 cm.s⁻¹). De seguida colocou-se a velocidade do tapete em 42,5 m.min⁻¹ (25 cm.s⁻¹) durante 4 minutos. Posteriormente, no fim de cada 4 minutos, a velocidade era incrementada em 17 m.min⁻¹ (10 cm.s⁻¹). O teste terminava quando o rato começa-se a dar sinais de cansaço.

3.4. Amostras Sanguíneas

Foram realizadas 3 colheitas de sangue ao longo desta experiência. Duas no primeiro grupo de ratos sujeito ao treino aeróbio de 8 semana, antes do início dos treinos e no fim dos treinos e pouco antes de se sacrificarem os ratos, e a terceira colheita no segundo grupo de ratos sujeito ao treino de uma semana.

Para a colheita de sangue foi necessário anestésiar os animais, o anestésico usado foi uma solução de cetamina e clorpromazina numa proporção de 2:1 respectivamente. A anestesia foi efectuada com uma seringa de 2 mL com uma agulha de 0,8 mm de diâmetro por 25 mm de comprimento, e a quantidade de anestésico dada a cada rato foi dependente do seu peso à razão de 125 mg/Kg. A colheita foi efectuada através de punção na veia jugular e foram colhidos cerca de 1,5 mL de sangue de cada rato para a seringa, e depois colocados em tubos de ensaio (numerados consoante o número que tínhamos atribuído a cada rato previamente) de 5 mL, de poliuretano, próprios para tecido sanguíneo, onde previamente tínhamos colocado 0,5ml de anticoagulante ACD 3,8%.

À medida que íamos completando a extracção de sangue de cada rato, isolávamos o tubo de ensaio do mesmo para depois o transportarmos para o Laboratório de Fisiologia do Músculo onde iríamos realizar a preparação das amostras de plaquetas.

O objectivo desta fase de preparação das amostras de plaquetas é separar precisamente as plaquetas de outros elementos sanguíneos, para posteriormente fazermos a análise das isoformas de NOS (óxido nítrico sintetase) presente nas plaquetas.

Para fazermos esta separação, começámos por centrifugar o sangue, que já estava colocado em tubos de ensaio, a 90,7 G, a 15°C, durante 15 minutos. De seguida retirámos o sobrenadante desses tubos para novos tubos de ensaio devidamente identificados e colocámos esses tubos novamente na centrífuga a 700 G, a 5°C, durante 15 minutos. Depois da centrifugação, retirámos novamente o sobrenadante e colocámos em tubos eppendorf numerados e datados e guardar na arca a -20°C, esta amostra é o soro que mais tarde será usada. Entretanto preparámos uma solução de tampão lise para adicionar ao sedimento de plaquetas: 38,8µg de phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) diluído em 1mL de metanol, adicionámos 10 µl deste preparado por cada mL

de tampão lise. Desta solução, adiciona-mos 250 µL dela ao restante pellet contido no tubo de ensaio que saiu da centrífuga e ressuspendemos o pellet, de plaquetas. A suspensão de plaquetas foi colocada em gelo (4°C) durante 30 minutos. Seguidamente centrifugamos as amostras a 2268 G, 4°C durante 45 min. Por fim, retirámos o sobrenadante para tubos eppendorfs numerados e datados e congelar numa arca a -20°C.

3.5. Sacrifício dos animais e extracção dos Músculos

A colheita dos tecidos para análise histológica, foi feita após a colheita de sangue aos ratos. A eutanásia foi feita com o anestésico usado anteriormente. Após o sacrifício dos ratos procedeu-se à colheita dos músculos.

Todo este procedimento é feito com uma tesoura e uma pinça, onde com um prévio conhecimento da anatomia do rato, se vai cortando tecido adiposo e conjuntivo até localizarmos o tecido pretendido para retirar uma porção para amostra.

Para esta análise colhemos amostras dos seguintes tecidos, por esta ordem cronológica:

1. Amostra de músculo Gastrocnemius lateral direito;
2. Amostra de músculo Solear direito;
3. Amostra de músculo Gastrocnemius lateral esquerdo;
4. Amostra de músculo Solear esquerdo;

3.6. Western Blot

As amostras referentes às porções dos membros direitos dos animais foram colocadas em papel de alumínio, numeradas e colocadas em azoto líquido à medida que iam sendo colhidas. Posteriormente colocámo-las todas a -80°C, numa arca. Estas amostras irão ser alvo dos estudos moleculares em Western Blot.

Decidimos usar as amostras dos membros direitos dos animais nas análises de Western Blot, para realizar-mos em todos os animais do mesmo lado, sendo que as porções do lado esquerdo foram usadas para o procedimento seguinte.

No procedimento de Western Blot, começámos por preparar tampão de Lise para as amostras, fizemos uma solução de 1mL de metanol + 38,8 mg de PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride). Retirámos 25 µL desta solução e adicionámos a 2,5 mL de solução de tampão lise geral. Desta solução final de tampão de Lise, colocámos 15 µL em cada uma das quatro amostras de tecido muscular (tecido muscular de gastrocnemios de rato exercitado e outra de rato controlo, tecido muscular solear de rato exercitado e outra de rato controlo) e colocámos num tubo de ensaio, o qual foi levado a um homogeneizador para fragmentar o tecido.

Seguidamente realizámos a determinação da concentração de proteína de albumina em cada para mais tarde sabermos a quantidade de amostra a utilizar no processo de electroforese. A concentração de proteína foi determinada por método espectrofotométrico, a um comprimento de onda de 595 nm, usando um kit comercial (Bio-Rad Protein Assay). Para a obtenção da curva padrão foi usada uma solução de albumina sérica bovina, sendo que o valor da quantidade de proteína necessária que precisámos foi de 80 µg.

De referir que toda a H₂O que usámos daqui para a frente é H₂O ultra purificada, ou água miliq.

Depois, preparámos todas as soluções que necessitámos ao longo deste processo. Preparámos as soluções de Tris-Base 2,0M com pH 6,8 (24,22g de Tris-Base em solução com H₂O até perfazer 100 mL), Tris-Base 1,5M com pH 8,8 (18,185g de Tris-Base em solução com H₂O até perfazer 100 mL), Tris-Base 1,0M com pH 6,8 (12,11g de Tris-Base em solução com H₂O até perfazer 100 mL) e Tris-Base 1,0M com pH 7,5 (60,555g de Tris-Base em solução com H₂O até perfazer 500 mL), o pH destas três soluções foi acertado com recurso a HCl concentrado de 1M.

Depois preparámos a solução de Tampão de Carga concentrada a 2X (3,125 mL de Tris-Base 2M com pH 6,8, 5 mL de Glicerol, 1 g de SDS(sodium dodecyl sulfate), 2 mg de Azul de Bromofenol, em solução de H₂O até 25 mL). De referir que dividimos esta solução em alíquotas de 490 µL e congelámo-las por forma a só se descongelarem

quando fossem necessárias, antes de usar a solução contida nas alíquotas temos de adicionar 10 μ L de 2-mercaptoetanol a cada alíquota.

Seguidamente preparámos a solução de Tampão de Electroforese concentrada a 10X (30,20 g de Tris-Base, 144 g de Glicina, 10 g de SDS, em solução de H_2O até 1000 mL).

Depois preparámos a solução de Tampão de Transferência concentrada a 10X (24 g de Tris-Base, 142,6 g de Glicina, em solução de H_2O até 1000 mL).

E por fim preparámos a solução de Tampão de Lavagem (1 mL de Tween 20, 50 mL de NaCl 3M, 20 mL de Tris-Base 1M com pH 7,5, em solução de H_2O até 1000 mL).

Feitas as soluções a utilizar nesta primeira fase (Electroforese e Transferência), passamos á montagem do processo de Electroforese. Começámos por descongelar as amostras de músculo e plaquetas que estavam congeladas colocando-as em gelo, para descongelarem sem grandes gradientes de temperatura. Seguidamente lavámos os vidros e todos os componentes do equipamento de electroforese com metanol a 75%. De referir que nos vidros efectuamos o procedimento de os riscar, lavá-los com um esfregão por forma a criar riscos na sua superfície para assim criar mais atrito no gel e assim maior interacção. Feito isto montámos o suporte para um sistema com a grossura de 1 mL e volume máximo a carregar de 60 μ L por carril.

De seguida iniciámos a preparação do Running Gel a 10% (7,9 mL de H_2O , 6,7 mL de Acrilamida mix 30%, 5 mL de Tris-Base 1,5M com pH 8,8, 200 μ L de SDS 10%, 8 μ L de TEMED), agitámos esta solução com uma pipeta e colocámo-la entre os vidros, até aproximadamente 1 cm do topo do vidro menor. Sobre o gel fizemos um “risco” de água, por forma a evitar o contacto de oxigénio com o gel, que altera as propriedades da polimerização, sendo que a polimerização demora cerca de 5 minutos. Para controlarmos melhor o estado da polimerização deixámos um pouco do mesmo gel num copo por forma a certificar quando este estivesse polimerizada também o gel entre os vidros estaria. Após a polimerização removemos a água invertendo os vidros e removendo os restos de água com papel absorvente.

De seguida preparámos o Stacking Gel (4,1 mL de H_2O , 1 mL de Acrilamida mix 30%, 750 μ L de Tris-Base 1M com pH 6,8, 60 μ L de SDS 10%, 6 μ L de TEMED),

agitando a solução com uma pipeta. Depois colocámos os pentes dentro dos vidros (para dar forma aos poços onde vamos colocar as amostras) e adicionámos a solução de stacking gel, com o cuidado de não criar bolhas de ar. Após o processo de polimerização, que controlámos da mesma forma como o do running gel, retirámos os pentes, lavámos com água e retirámos os restos de água com papel absorvente.

De seguida preparámos as amostras que por esta altura já estavam descongeladas. Das amostras retirámos o volume correspondente à quantidade de proteína desejada (80 μ L) e adicionamos-lhe tampão de carga na proporção de 1:1, depois fervemos as amostras durante 3 minutos por forma a quebrar as ligações terciárias e quaternárias das proteínas, após fizemos vortex das mesmas por forma a que todas as gotas ficassem no fundo do tubo eppendorf e colocámos novamente em gelo. Depois preparámos a solução diluída a 1X de Tampão de Electroforese (100 mL de tampão de electroforese a 10X e 900 mL de H₂O).

De seguida colocámos os vidros com os géis na cuvette de electroforese e enchemos a cuvette com o tampão de electroforese 1X até cerca de metade. Depois, com muito cuidado carregámos as amostras e o marcador de peso molecular nos poços (ou carris) dos géis, sendo que não utilizamos os poços dos extremos como medida de precaução. Perfizemos o restante volume que remanesceu após a colocação das amostras com tampão de electroforese. Perfizemos o restante volume da cuvette com tampão de electroforese e fechamos o suporte e ligámos os cabos de corrente eléctrica á fonte de alimentação (alimentador da Bio-Rad) e colocámos os parâmetros em 150 Volts, 400 mA, 200 Watt durante cerca de 60 minutos, controlávamos o estado do processo observando a criação das bandas pelo marcador.

Enquanto a electroforese terminava iniciámos a preparação do processo de transferência. Preparámos 1 L de tampão de transferência a 1X (100 mL de tampão de transferência a 10X, 100 mL de metanol e 800 mL de H₂O) e colocámo-lo a 4°C e colocámos todo o material a ser utilizado imerso em tampão de transferência. Cortámos a membrana de PVDF conforme as necessidades do nosso gel e activamo-la, colocando-a durante 5 segundos numa cuvette com metanol puro, retirámo-la e juntamo-la aos restantes materiais imersos em tampão de transferência. Entretanto terminou a electroforese e retirámos os vidros e soltámos os géis destes, colocando-os depois em tampão de electroforese e deixámo-lo a equilibrar durante 10 minutos. Depois

preparámos a cuvette de transferência colocando lá dentro gelo e íman, por baixo da cuvette colocámos o sistema do agitar magnético. De seguida colocámos um recipiente com tampão de transferência congelado a -20°C e colocámo-lo dentro da cuvette. Findo esta preparação iniciamos a montagem da “sandwich” de transferência com a colocação pela seguinte ordem: Plástico Branco – Esponja – Papel de Filtro – Membrana de PVDF – Gel – Papel de Filtro – Esponja – Plástico Negro, e colocamos a sandwich dentro da cuvette de transferência com o cuidado de que o lado do plástico negro coincida com o suporte negro dentro da cuvette, pois é por onde passa a corrente negativa, pelo suporte ranço passa a corrente positiva, depois perfizemos o volume da cuvette com tampão de transferência, fechámo-la e ligámos os cabos de corrente eléctrica á fonte de alimentação (alimentador da Bio-Rad) e colocámos os parâmetros em 500 Volts, 200 mA, 200 Watt durante cerca 120 minutos. Colocámos todo este sistema dentro de um recipiente cheio de gelo por forma a baixar a temperatura, visto que o processo de transferência liberta muita energia sob a forma de calor.

Perto do fim do processo de transferência preparámos a solução de Tampão de Lavagem (50 mL de tampão de transferência misturado com 500 mg de BSA (albumina bovina sérica)).

Terminada a transferência, retiramos as membranas e lavamo-las com tampão de lavagem para retirar restos de sais. Depois colocámos cada membrana num recipiente com tampão de bloqueio, cobrimo-lo com papel de alumínio e colocámos a 4°C durante a noite.

Na manhã seguinte, retiramos as membranas e lavamo-las duas vezes num recipiente com tampão de lavagem durante 10 minutos cada lavagem, sob agitação, de modo a agitar tanto a membrana como o líquido.

Após a esta lavagem demos começo á incubação com os anticorpos. Primeiro fizemos a incubação com o anticorpo primário, solução de 10 mL feita no momento com a constituição de tampão de lavagem + anticorpo primário, na proporção de 1:1250. Colocámos a membrana com a solução preparada num recipiente e mantivemo-los em incubação com agitação durante 90 minutos. Após esta incubação, fizemos nova lavagem, semelhante á anterior, com a diferença de termos feito três lavagens de 7 minutos cada. De seguida preparámos a solução de anticorpo secundário, solução de 10 mL feita no momento com a constituição de tampão de lavagem + anticorpo secundário,

na proporção de 1:20000. Colocámos a membrana com a solução preparada num recipiente e mantivemo-los em incubação com agitação durante 30 minutos. No fim realizámos três lavagens de 7 minutos cada.

Para finalizar o processo de Western Blot fizemos a revelação das membranas. A partir da solução comercial ECF (Amersham Pharmacia Biotech, RPN 2106), misturámos 3 mL do Reagente 1 com 3 mL do Reagente 2 e colocámos num recipiente com a membrana durante 3 minutos. Depois retirámos a membrana e retirámos o excesso de líquido com papel absorvente e levámos a membrana ao instrumento óptico de revelação (câmara de revelação Kodak), que com o devido software possibilitou-nos tirar fotografias às bandas que apareceram nas membranas.

3.7. Análise Histológica

As amostras referentes às porções do lado esquerdo dos membros dos animais foram colocadas em papel de alumínio e enviadas para o hospital prontamente. No hospital estas amostras foram seccionadas para se extraírem apenas as fibras musculares, para posterior sessão fotográfica das mesmas, para avaliar a estrutura morfológica dos tecidos.

Para esta análise baseamo-nos no procedimento da ATP-ase a pH 9,4 e pH 4,35 (Henwood, 2009). O princípio deste método reside na capacidade da enzima de remover o fosfato terminal ao ATP, que depois combinado com o cálcio da solução de incubação formam fosfato de cálcio insolúvel. Depois o cálcio é substituído por cobalto, que após reacção com sulfato de amónia forma sulfato de cobalto, que mancha a zona da actividade da enzima a preto.

3.8. Análise Estatística

Todos os dados analisados estão expressos como média \pm SEM (nomenclatura inglesa para standard error means), sendo que todas as variáveis foram comparadas usando o teste t de Student para valores não emparelhados. Tomámos como significativos os valores de $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Evolução do peso, velocidade e tempo de corrida com o treino

A análise do peso dos animais em estudo ao longo do período de exercício aeróbio mostrou uma evolução equivalente em ambos os grupos (controlo e treinados) (Gráfico 1). A evolução do peso observada em ambos os grupos corresponde ao normal da espécie.

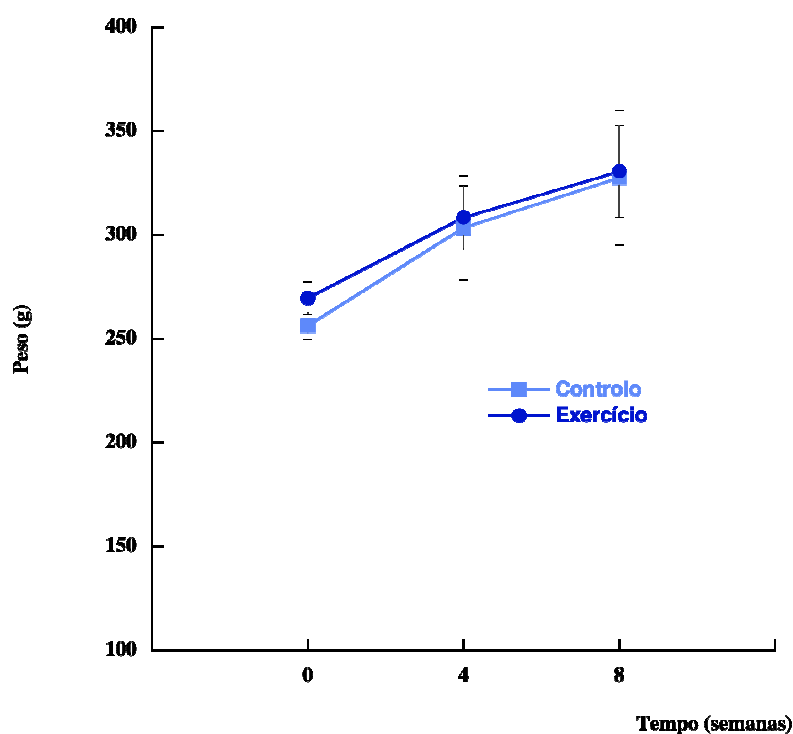


Gráfico 1. Pesos dos animais em estudo. Controlo (n=5) - grupo de animais sem treino; Exercício (n=6) – animais sujeitos a exercício aeróbio durante oito semanas em tapete rolante (como descrito na secção metodologia). Cada símbolo representa a média dos valores e as linhas verticais o erro padrão.

Como se pode constatar tanto o grupo de ratos controlo (azul claro) como o grupo de ratos exercício (azul escuro) aumentam os seus pesos ao longo das oito semanas de experiência. Sendo que inicialmente têm uma maior diferença, 260 g para os ratos controlo e 275 g para os ratos exercício, que no final, onde têm praticamente o

mesmo peso, cerca de 330 g para cada grupo. Nota-se que na primeira parte do treino (primeiras quatro semanas), têm um aumento de peso mais considerável. De referir que no início os ratos estavam nas mesmas condições, ou seja, tinham oito semanas de vida e até então tinham estado no biotério em condições de repouso, e que só ao fim das oito semanas de experiência os dois grupos de ratos já não estavam nas mesmas condições, um com treino outro sem.

De forma a verificar a eficácia do treino realizado, todos os animais foram sujeitos a um teste de velocidade/resistência (como descrito na metodologia). Verificámos que os ratos que efectuaram um treino de oito semanas realizaram o teste durante mais tempo (Gráfico 2) quando comparados com o grupo controlo.

Também no que se refere à velocidade o treino se mostrou eficaz uma vez que o grupo de ratos treinado realizou o teste com maior velocidade quando comparados com o grupo controlo (Gráfico 3).

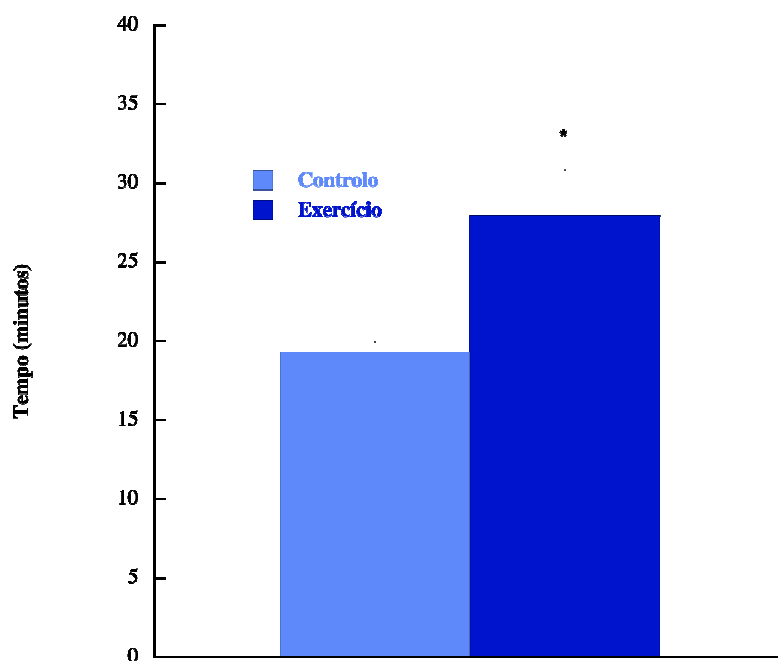


Gráfico 2. Tempo de duração do teste de velocidade/resistência, em minutos. As barras representam médias dos tempos realizados pelos animais controlo (n=5) e treinados (n=6). As linhas verticais representam o erro padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controlo.

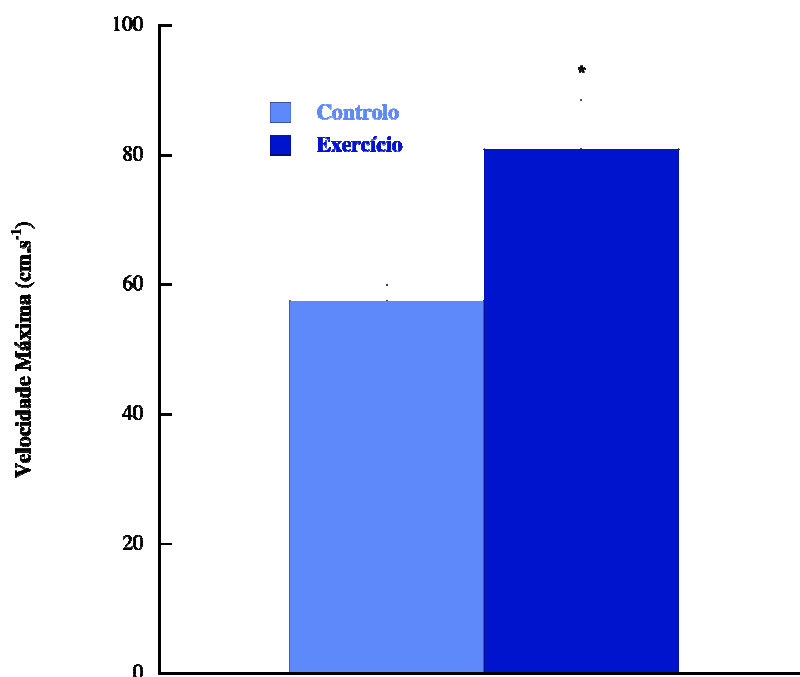


Gráfico 3. Velocidade máxima atingida (cm.s⁻¹) durante o teste de velocidade/resistência. As barras representam médias e as linhas verticais o erro padrão das velocidades atingidas pelo grupo controlo (n=5) e pelo grupo treinado (n=6). *p<0,05 relativamente ao grupo controlo.

O condicionamento físico obtido por parte dos animais com o treino ou não treino a que foram sujeitos, foi avaliado através do teste de velocidade. Neste teste de velocidade nota-se claramente que partindo das condições iniciais (velocidade máxima e tempo de corrida) (Tabela IV), após o período de treinos, os ratos que foram sujeitos a treino aumentaram as suas performances a nível da velocidade máxima e tempo, em 33,9% e 21,5% respectivamente. Enquanto os ratos que foram sujeitos a regime de controlo regrediram nestes dois campos, diminuindo 5% na velocidade máxima e 22% no tempo de corrida.

Tabela IV. Dados da performance das velocidades e tempos de corrida no teste de velocidade/resistência dos ratos treinados (n=6) e controlo (n = 5). *p<0,05 do grupo treinado relativamente ao controlo.

	Tempo (minutos)	Velocidade máxima (cm.s⁻¹)	
Antes do treino	19.39 ± 2.03	60,56 ± 5,3	
			Variação
Após o treino (ratos exercitados)	23.56 ± 6.25*	81,00 ± 16,7*	Velocidade: + 33,9% Tempo: + 21,5%
Após o treino (ratos controlo)	15.18 ± 1.19	57,50 ± 5	Velocidade: - 5% Tempo : - 22%

4.2. Quantificação percentual das fibras musculares nos dois músculos

Da análise da percentagem relativa das fibras musculares esqueléticas tipo I e tipo II no músculo solear, verificámos que tal como descrito na literatura, o referido músculo apresenta uma dominância de fibras tipo I. De notar que se considera a dominância de fibras quando um determinado tipo ultrapassa os 60% de ocorrência. Após o exercício, o grupo treinado aumentou a percentagem relativa de fibras do tipo I, em detrimento das fibras de tipo II, revertendo praticamente todas as fibras em tipo I, ficando com apenas cerca de 3% da sua constituição referente a fibras do tipo II, como se pode observar no Gráfico 4 (Fry et al, 2003; Powers e Howley, 2000).

Relativamente ao músculo gastrocnemius lateral a dominância de fibras é do tipo II, tal como verificado na literatura. Neste músculo o exercício aeróbio intenso de oito semanas também não alterou a dominância do tipo de fibras mais comuns neste tipo de músculo, tendendo também para um aumento dessas fibras maioritárias iniciais, ou seja, as fibras tipo II (Gráfico 5), se bem que esse aumento foi muito ligeiro (Portal et al, 2004).

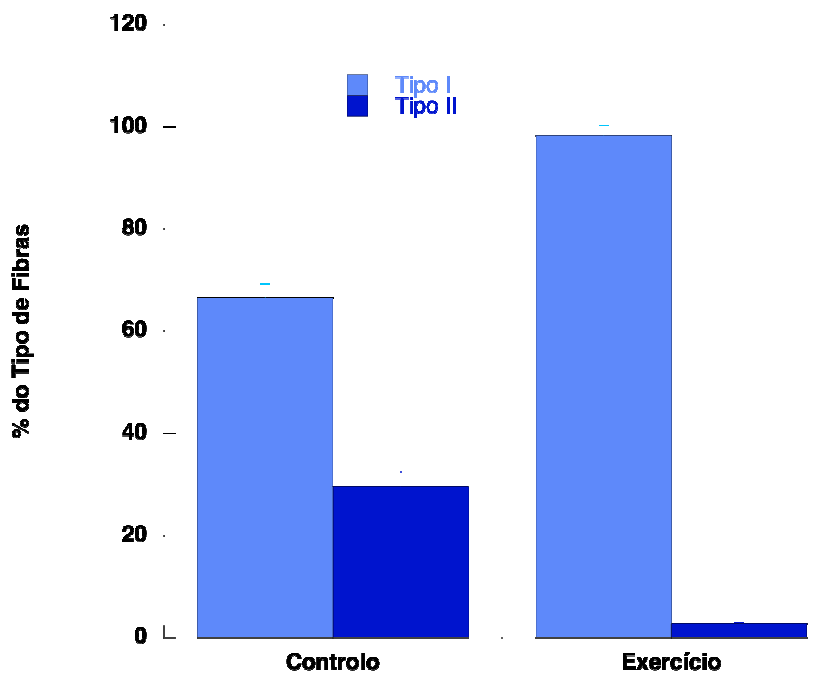


Gráfico 4. Percentagem relativa das fibras musculares esqueléticas tipo I e tipo II no músculo solear dos ratos em estudo (controlo vs exercício). As fibras foram contadas em fotos digitalizadas num campo fixo. A contagem foi efectuada três vezes num número mínimo de 500 fibras.

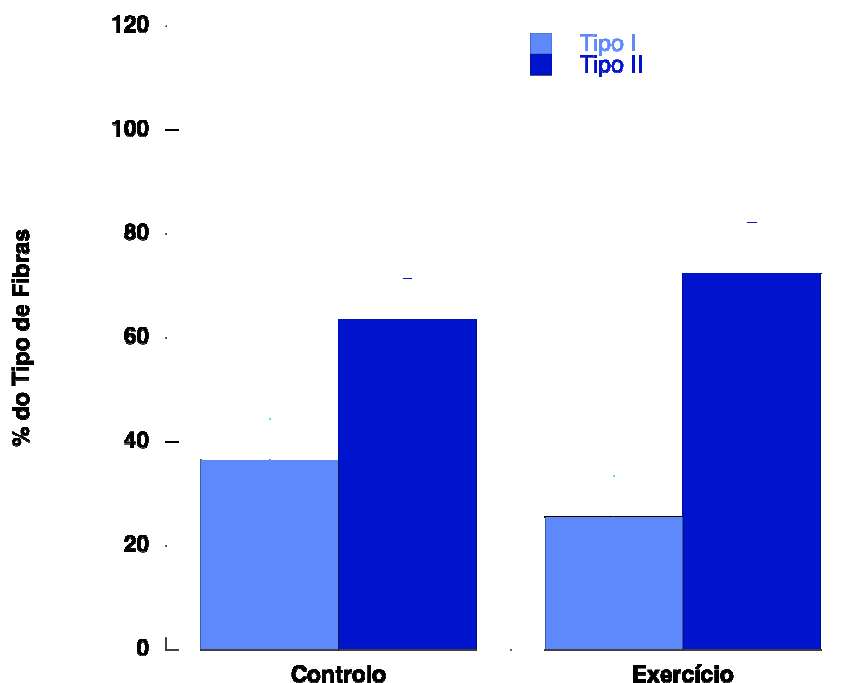


Gráfico 5. Percentagem relativa das fibras musculares esqueléticas tipo I e tipo II no músculo gastrocnemius lateral dos ratos em estudo (controlo vs exercício). As fibras foram contadas em fotos digitalizadas num campo fixo. A contagem foi efectuada três vezes num número mínimo de 500 fibras.

4.3. Expressão das isoformas cNOS e iNOS nos dois músculos e nas plaquetas

A análise da expressão da proteína sintetase do óxido nítrico (NOS) revelou que quando analisamos o grupo controlo verificámos que a expressão da isoforma constitutiva da NOS (cNOS) é maior no músculo solear e nas plaquetas do que no músculo gastrocnemius lateral (Gráfico 6). No que se refere à forma inductível, o músculo solear é o que apresenta menor expressão e as plaquetas a maior expressão desta isoforma, ficando a expressão desta isoforma no gastrocnemius lateral com um valor intermédio em relação aos outros dois elementos (Gráfico 7).

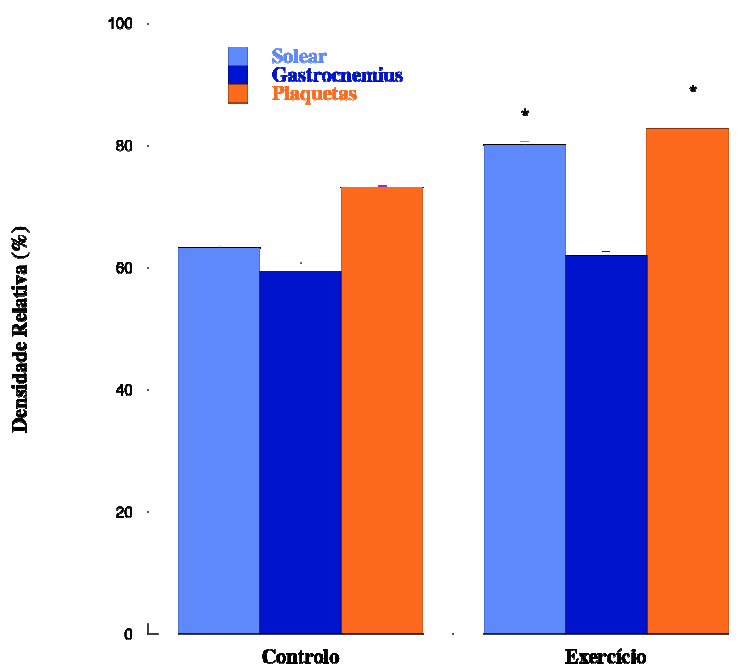


Gráfico 6. Densidade relativa (%) da expressão da cNOS nos dois músculos em estudo e nas plaquetas. * $p < 0,05$ relativamente ao grupo controlo.

Após a realização do exercício de oito semanas verificámos que a forma constitutiva aumenta a sua expressão nas plaquetas e no músculo solear e mantêm-se constante no músculo gastrocnemius lateral (Gráfico 6). Quando comparado com a variação do tipo de fibras o comportamento na cNOS apresenta uma relação directa para as fibras tipo I entre o músculo solear e as plaquetas (Gráfico 6).

O comportamento da expressão da iNOS mostra-se semelhante à isoforma anterior. Deste modo, podemos observar que a expressão da iNOS aumenta no músculo

solear e nas plaquetas. No músculo gastrocnemius lateral não apresenta alterações (Gráfico 7). À semelhança da cNOS, a iNOS apresenta uma correlação directa entre a variação de fibras tipo I e a sua expressão. Neste caso, o comportamento verificado para o músculo solear é equivalente ao das plaquetas.

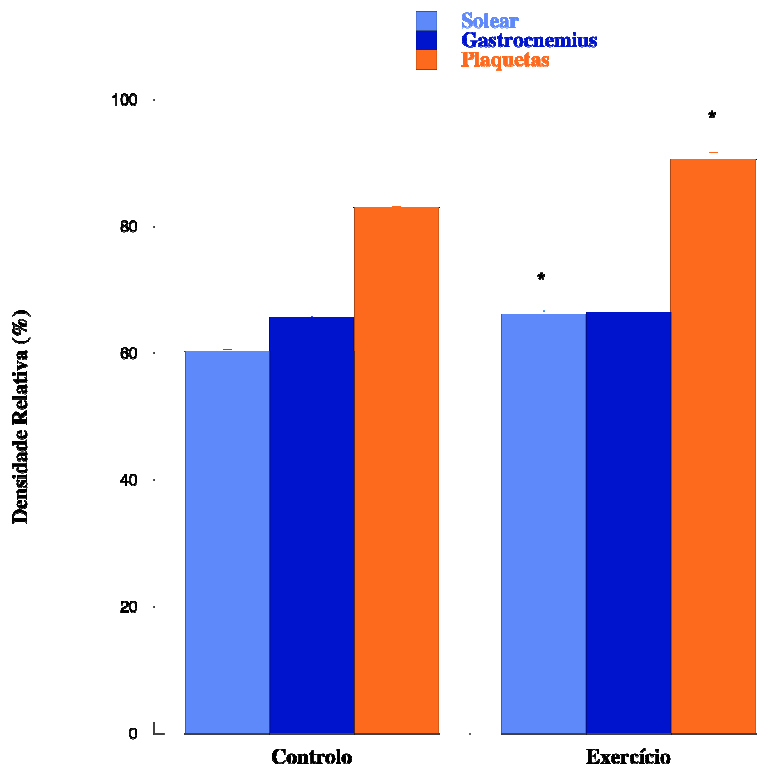


Gráfico 7. Densidade relativa (%) da expressão da iNOS nos dois músculos em estudo e nas plaquetas. * $p < 0,05$ relativamente ao grupo controlo.

5. Discussão

Com o objectivo de se testarem dois grupos de ratos diferentes, isto é um grupo de repouso e um grupo treinado, optámos por induzir aos ratos de exercício o plano de treinos especificado na secção de Metodologia durante oito semanas, após análise de estudos de Yoshinobu et al (2005) no qual se conclui independentemente do objectivo da investigação, para se obter uma boa condição física aconselha-se a realizar mais do que três sessões semanais de treino e não mais de seis, durante pelo menos seis semanas, por isso optámos por realizar cinco sessões semanais, durante os dias de semana, e dar descanso aos ratos dois dias seguidos, durante oito semanas, de forma a não entrarem também em regime de excesso de treino (overtraining), o que inviabilizaria o estudo corrente, como mostram estudos de Hohl et al, (2009).

Com os resultados obtidos dos dois testes de velocidade realizados, antes e depois das oito semanas de treino, podemos concluir que de facto as sessões de treino que os ratos de exercício realizaram diferenciaram-nos dos ratos controlo. Os nossos resultados mostraram um condicionamento muscular proveniente do treino realizado bastante bom, tendo em conta outros estudos (Lambert et al, 1996) , nos quais para valores testados antes do treino e valores obtidos após o treino, os ratos exercitados apresentavam uma melhoria de 13% enquanto os ratos controlo um decréscimo de 10%, referentes á velocidade máxima atingida, enquanto no nosso estudo esses valores também se mostraram como uma melhoria para os ratos treinados, de 34%, e um decréscimo para os ratos controlo, de 5%. A nível das variações do tempo de teste aguentado pelos ratos, também se nota as mesmas variações, ou seja, os ratos treinados aumentaram o seu tempo de teste, em 21,5%, e os ratos de controlo diminuíram o seu tempo de teste, em 22%, o que também se verifica nos restantes estudos, sendo que nos dados do estudo apresentado (Lambert et al, 1996), as variações foram de +17% para os ratos treinados e -12% para os ratos controlo.

Tabela V. Dados da performance das velocidades e tempos de corrida no teste de velocidade obtidos no trabalho realizado por Lambert et al. em 1996.

TABLE 1		
MAXIMAL SPRINTING SPEED, HIGH INTENSITY RUNNING PERFORMANCE, AND SUBMAXIMAL RUNNING ENDURANCE IN CONTROL AND TRAINED RATS AT 0 AND 8 WEEKS		
	Control	Trained
Sprinting speed ($\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$)		
<i>n</i>	28	28
0 weeks	55.0 ± 1.5	57.4 ± 1.5
8 weeks	49.1 ± 1.6	$65.0 \pm 2.0^*$
High intensity performance (min)		
<i>n</i>	19	19
0 weeks	22.2 ± 0.6	21.8 ± 0.6
8 weeks	19.5 ± 0.5	$25.6 \pm 1.0^*$
Submax endurance (min)		
<i>n</i>	28	28
0 weeks	64.0 ± 8.5	67.1 ± 7.8
8 weeks	$25.8 \pm 3.4^\dagger$	$115.0 \pm 13.6^*$

Quanto aos valores concretos da velocidade máxima atingida, de 80 cm.s^{-1} (48 m.min^{-1}) para os ratos exercício e 59 cm.s^{-1} ($35,4 \text{ m.min}^{-1}$) para os ratos controlo, estes valores encontram-se um pouco abaixo dos valores atingidos por vários estudos o que concerne á capacidade física dos ratos (Lambert et al, 1996 e Behzad et al, 2009), o que se pode explicar pelo facto de no nosso teste cada patamar ter a duração de 4 minutos, enquanto nos estudos referidos esse patamar é de 30 segundos. No que concerne ao tempo atingido de corrida, obtivemos valores de 28 minutos para os ratos exercício e 19 minutos para os ratos controlo, o que se enquadra nos resultados obtidos pelos dois estudos mencionados previamente, o que nos leva a concluir, que apesar de os nossos patamares de velocidade durarem mais tempo, os ratos em ambos os estudos já se encontravam a uma velocidade bastante alta, o que os levou a aguentar as corridas por períodos de tempo semelhante. Ou seja enquanto no período em que no nosso estudo o rato percorreu um dos últimos patamares a 75 cm.s^{-1} durante os 4 minutos, no estudo de Lambert et al, (1996) ele percorreu 8 patamares entre as velocidades de 12 cm.s^{-1} (7 m.min^{-1}) e 109 cm.s^{-1} (65 m.min^{-1}), o que nos leva a sugerir que um dos nossos

patamares de 4 minutos à velocidade de 75 cm.s^{-1} é equivalente em capacidade física ao esforço dispendido nos patamares executados entre os 12 cm.s^{-1} e os 109 cm.s^{-1} .

As diferenças entre as percentagens dos dois estudos podem dever-se a vários factores, tais como o tipo de ratos, as velocidades de cada patamar de teste, a duração de cada patamar do teste, porém com o objectivo de sujeitar os ratos a um treino que os fizesse sofrer alterações a nível de capacidade física, é um facto que tal aconteceu, como prova a evolução positiva dos ratos treinados e a evolução negativa dos ratos controlo em consonância com outros estudos.

Dos resultados obtidos da medição do peso dos animais, conclui-se que não há variações de relevância entre o peso dos animais treinados e os animais controlo do início para o fim do período de experiência. Dado todas as condicionantes a que os animais foram sujeitos, e a diferenciação apenas existir no facto de uns terem tido treino e outros repouso, poderia levar a pensar que os animais controlo, visto não terem executado exercício físico aeróbio, como o grupo treinado, acumulassem mais massa gorda que o grupo dos treinados, pela razão do dispêndio energético diferenciado entre cada um dos grupos, de acordo com os estudos de Kim et al, (2008) e de Abbass et al, (2009). Seria portanto de esperar que como o grupo controlo teve um dispêndio energético bastante mais reduzido, tal se traduzisse num aumento de peso, mais concretamente de gordura. Porém, também sabemos, que pelo facto de os animais treinados despendem muita energia no exercício também desenvolveram mais os seus músculos, logo a gordura que nos animais controlo se acumulou, nos animais exercitados foi convertida num maior volume muscular, facto esse que foi bastante notório a quando da colheita de amostras dos animais, e que levou a um peso semelhante entre ratos controlo e exercitados, factos também notados em estudos de Ebal et al, 2007. Durante a colheita de amostras de tecido muscular deu para diferenciar á vista desarmada quais os animais que foram sujeitos a treino e quais os sedentários, pois os animais exercitados mostraram uma maior definição e volume muscular, enquanto os animais controlo evidenciavam grandes massas de tecido adiposo.

Para fazer maiores comparações a este nível, como determinar se os ratos exercitados ficaram com maior volume que os controlo, teriam sido necessário outros estudos que não foram o âmbito deste projecto (por exemplo a medição de volume, determinação da densidade corporal a fim de notar se a nova massa muscular dos ratos exercitados era mais densa que a massa adiposa dos controlo).

No que concerne ao estudo da expressão das isoformas de NOS, sabe-se que o NO tem um papel importantíssimo a nível do funcionamento da fisiologia do músculo esquelético, sendo ele um mensageiro biológico, servindo como mediador do metabolismo, da captação de glicose, contractilidade das fibras musculares, produção de força, sinalização neuromuscular, bem como controlando a perfusão sanguínea (Balon e Nadler, 1997; Reid, 1998; Stamler e Meissner, 2001).

O mecanismo molecular pelo qual o NO modula as funções de proteínas sensíveis à redução e à s-nitrosilação, característica das proteínas constituintes das fibras musculares, necessita de mais estudos para ser clarificado (Stamler et al, 1997), no entanto, o stress oxidativo e a produção de radicais livres tais como espécies reactivas de oxigénio derivadas do NO parecem estar relacionadas com a actividade muscular. Logo, alterações significativas dos sinais do NO podem subsequentemente alterar as funções musculares normais, podendo conduzir a estados de fadiga (Kondo et al, 1993; Reid, 1998; Kingwell, 2000).

Uma das causas que pode afectar essa sinalização dependente de NO é o descondicionamento continuado do músculo, o que pode directa ou indirectamente conduzir a mecanismos de atrofia do mesmo, o que leva a alterações das funções contrácteis e de geração de força por parte dos músculos (Buck e Chojkier, 1996).

A isoforma da NOS que se expressa em maior quantidade no músculo esquelético, a cNOS (Nakane et al, 1993; Kbizik et al, 1994), está associada ao complexo distrofina-glicoproteína (Brenman et al, 1995), que é um sistema transmembranar multicelular nas células musculares esqueléticas (Ervasti e Campbell, 1991) e que é o ponto de ligação transmembranar entre a laminina da matriz extracelular e a actina intracelular do citoesqueleto (Ervasti e Campbell, 1993) que suporta a estabilização mecânica da membrana durante o processo de contracção.

No músculo esquelético, a forma indutível da NOS, a iNOS, é sobre-regulada pela acção das citocinas, como as interleucinas e o factor-nuclear-kappaB, NFkB (Adams et al, 2002). Sendo que existe prova de alterações dos níveis proteicos da iNOS em alguns estados clínicos, como a necrose de fibras musculares e as miopatias inflamatórias (Riede et al, 1998).

No nosso trabalho não foi feita, relativamente às isoformas constitutivas a determinação da expressão da nNOS pelo que os resultados podem ter sido influenciados pela sua ausência. Esta proteína é expressa em grande quantidade nas fibras musculares do tipo II e sub-regulada por grandes quantidades de NO produzido.

Por outro lado, a eNOS é expressa em maior quantidade pelas fibras oxidativas o que está de acordo com os resultados encontrados para o músculo solear onde aumenta a expressão da cNOS (endotelial no nosso caso).

Como já foi explicado na secção da introdução, o NO é formado a partir da L-arginina, porém nesse mesmo processo a L-arginina forma também L-citrulina, sendo que esses dois produtos da L-arginina, o NO e a L-citrulina, podem-se converter um no outro, equilibrando assim a sua produção. Estas alterações de NO em L-citrulina e o inverso está relacionado com a utilização do NO que vai mais além do relaxamento muscular. O NO pode também converter-se em nitratos ou em radicais livres de oxigénio, entrando assim num processo oxidativo prejudicial para o organismo, ora este processo de conversão entre estas duas moléculas, NO e L-citrulina, designado por passo limitante serve como meio de atenuar estes muitos usos do NO.

Sendo que, o passo limitante da produção de NO, bem como a disponibilidade de L-arginina, são de extrema importância após a indução da iNOS (ou NOS2).

No presente trabalho a expressão da iNOS e músculos de rato controlo pode estar relacionada com processos de necrose celular e focos inflamatórios encontrados nos músculos dos animais controlo (apenas com habituação motora ao tapete rolante). A indução após o exercício poderá estar relacionada com factores bioquímicos libertados durante o exercício e/ou associados a processos de adaptação das fibras musculares.

A mesma explicação é válida para as plaquetas.

Sendo que em ambas as isoformas só verificamos aumentos para as plaquetas ou para o músculo em que predominam as fibras tipo I, pelo que nos parece ser possível associar as variações da expressão das duas isoformas da NOS com a variação de número das fibras tipo I ou oxidativas lentas.

Neste sentido, as plaquetas parecem traduzir as alterações referidas podendo ser um instrumento de estudo útil, tal como era nosso objectivo demonstrar.

6. Conclusão

Com o propósito de estudar a influência da actividade física aeróbia nas adaptações a nível das fibras musculares e a sua relação com a expressão das isoformas da NOS como forma de se avaliar a possibilidade de tomar essa expressão como um marcador periférico para avaliação dessas mesmas alterações fisiológicas a nível muscular, este presente estudo serviu esses propósitos.

Conseguimos identificar as alterações a nível das fibras musculares resultantes do condicionamento físico imposto aos animais, notando isso nas alterações de percentagens relativas dos dois tipos de fibras musculares em estudo, tipo I e tipo II, nos dois músculos dos membros inferiores dos ratos, o músculo gastrocnemius e o músculo solear, dos animais controlo para os animais exercitados. Sendo que para o músculo solear, um músculo com predominância de fibras tipo I (animal controlo), notou-se uma reestruturação, ocorrendo um aumento dessas mesmas fibras de tipo I em detrimento das fibras de tipo II (animais treinados).

No músculo gastrocnemius, sendo um músculo maioritariamente de fibras tipo II (animais controlo), notou-se uma ligeira variação de diminuição de fibras tipo I com o decorrer do treino, mantendo assim a predominância tipo II, sendo que esta variação se torna insignificante pois pode dever-se a uma ligeira variação da contagem da pequena amostra que recolhemos desse músculo e não expressar a constituição macroscópica do músculo gastrocnemius.

Podendo assim concluir que ocorrem de facto alterações a nível do tipo de fibras musculares em cada um destes músculos devido ao treino a que foram sujeitos os animais.

Relativamente à expressão das duas isoformas da NOS podemos concluir que o exercício aeróbio aumenta a expressão de ambas as isoformas no músculo solear e nas plaquetas.

O aumento da expressão da cNOS e iNOS no músculo parece associar-se ao aumento das fibras tipo I.

Assim, os nossos resultados parecem sugerir que o aumento da expressão das isoformas da NOS nas plaquetas se correlacionam com o aumento de fibras musculares do tipo I.

7. Bibliografia

Bibliografia referenciada

- Abbass GN, Hossein A (2009). Treadmill training enhances rat agouti-related protein in plasma and reduces ghrelin levels in plasma and soleus muscle. *Metabolism Clinical and Experimental*;
- Adams V, Nehrhoff B, Spate U, Linke A, Schulze PC, Baur A, Gielen S, Hambrecht R e Schuler G (2002). Induction of iNOS expression in skeletal muscle by IL-1 beta and NF kappa B activation: an in vitro and in vivo study. *Cardiovasc Res* **54**: 95-104;
- Altman DG, Bland JM (1999). Variables and parameters. *BJM* **318**:1667;
- Argaw A, Desaulniers P, Gardiner PF (2004). Enhanced neuromuscular transmission efficacy in overloaded rat plantaris muscle. *Muscle Nerve* **29**:97-103;
- Armstrong RB, Warren GL, Warren JA (1991). Mechanisms of exercise-induced muscle fibre injury. *Sports Med* **12**:184-207;
- Arnold WP et al. (1977). Nitric oxide activates guanylatecyclase and increases guanosine 3',5'-monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Nat Acad Sci USA* **74**: 3203-3207.
- Balon TW e Nadler JL (1997). Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. *J Appl Physiol* **82**: 259-363;
- Barber AJ (1976). *Biochim Biophys Acta* **444**:579-595;
- Bates TE, Loech A, Burnstock G, Clark JB (1996). *Biochem Biophys Res Commun* **218**: 40-44;
- Behzad MK, Abbass GN, Ali SG, Mehdi E, Fatemeh R, Hossein A (2009). Endurance training enhances ABCA1 expression in rat small intestine. *Eur J Appl Physiol*;
- Bloom e Fawcett (1986). A textbook of Histology. Philadelphia. WB Saunders Company;
- Bredt DS, Snyder SH (1994). Nitric oxide: A physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* **63**: 175-195;
- Brenman JE, Chao DS, Gee DS, Magee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Bredt DS (1996). *Cell* **84**: 757-76;

- Brenman JE, Chao DS, Xia H, Aldape K e Bredt DS (1995). Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **82**: 743-752;
- Buck M e Chojkier M (1996). Muscle wasting and dedifferentiation induced by oxidative stress in a modelo f cachexia is prevented by inhibitors of nitric oxide synthesis and antioxidants. *EMBO J* **15**: 1753-1765;
- Burnette WN (1981). Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate — polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry (US Academic Press)* **112** (2): 195–203;
- Carlson, MB, Faulkner, JA (1983). The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: a review. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **15**:187-198;
- Chiang TM, Beachey EH, Kang AH (1975). *J Biol Chem* **250**: 6916-6922;
- Collins T (2000). Inflamação aguda e crônica. Patologia estrutural e funcional, 6.ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan: 1251;
- Costanzo LS (2002). Physiology (2nd ed.). Philadelphia: Saunders. pp. 23. ISBN 0-7216-9549-3;
- Davis KL et al. (2001). Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**: 203-236;
- Dubowitz V (1973). Histological and histochemical stains and reactions. Muscle biopsy: a modern approach. London Saunders; 20:102;
- Duda DG, Fukumura D, Jain RK (2004). Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells. *Trends in molecular medicine* **10** (4): 143–145;
- Ebal E, Cavalie H, Michaux O, Lac G (2007). Effect of a moderate exercise on the regulatory hormones of food intake in rats. *Appetite* **49**: 421-4;
- Edstrom L, Nystrom B (1969). Histochemical type and sizes of fibres in normal human muscles. A biopsy study. *Acta Neurol Scand* **45**:257;
- Ervasti JM e Campbell KP (1991). Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* **66**: 1121-1131;
- Ervasti JM e Campbell KP (1993). A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol* **122**: 809-823;
- Feldman PL, Griffith OW, Stuehr DJ (1993). The surprising life of nitric oxide. *Chem Eng News* **December 20**: 26-38;

- Fitts RH, Widrick JJ (1996). Muscle mechanics: adaptations with exercise training. *Exerc Sport Sci Rev* **24**:427-73;
- Förstermann U et al. (1991). Isoforms of EDRF/NOsynthase: Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol* **42**: 1849-1857;
- Frandsen U, Lopez-Figuero M, Hellsten Y (1996). Localization of NOS in human skeletal muscle. *Bioche And Biophy Research Comm* **227**: 88-93;
- Fry A, Webber L, Weiss L, Harber M, Vaczi M, Pattison A (2003). Muscle fiber characteristics of competitive power lifters. *J Strength Cond Res* **17**(2): 402-410;
- Gally JA, Montague PR, Reeke GN, Edelman GM (1990). The NO hyphotesys: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 3547-3551;
- Gilkeson G, Mudgetts J, Seldin MF, Ruiz P, Alexander A, Misukonis MA, Pistesky DS and Weinberg JB (1997). Clinical and serologic manifestation of autoimmune disease in MRL-Mice lacking Nitric Oxide Synthase Type 2. *J Exp Med* **186** (3): 365-373.
- Grounds MD (1991). Towards understanding skeletal muscle regeneration. *Pathology, Research and Practice* **187**:1-22;
- Guyton AC, Hall JE (2006). Tratado de Fisiologia Médica. 11^a Edição. Elsevier;
- Heckman CA, Jamasbi RJ (1999). Describing shape dynamics in transformed cells through latent factors. *Experimental cell research* **246**:69-82;
- Henwood T. Adenosine Triphosphatase (ATPases), BAppSc *GradDipSysAnaly CT(ASC)*;
- Hibbs JB Jr., Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM (1988). Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophysis Res Commun* **157**: 87-94;
- Hohl R, Ferraresso RL, De Oliveira RB, Lucco R, Brenzikofer R, De Macedo DV (2009). Development and characterization of an overtraining animal model. *Med Sci Sports Exerc* **41**(5):1155-63;
- Hou YC, Janczuk A, Wang PG (1999): Current trends in the development of nitric oxide donors. *Curr Pharm Des June* **5**(6): 417–471;
- Hurme T, Kalimo MO (1992). Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **24**:197-205;
- Iannuzo CD, Patel P, Chen V, O'Brien P, Williamns C (1994). Thyroidal trophic influence on skeletal muscle myosin. *Nature* **270**:74-6;

- Jackson CG, Dickinson AL, Ringel SP (1990). Skeletal muscle fibers area alterations in to two opposing modes of resistance exercise training in the same individual. *Eur J Appl Physiol* **61**:37-41;
- Jarvinen TAH, Jarvinen TLN, Kaariainen, M et al. (2005). Muscle injuries: biology and treatment. *The American Journal of Sports Medicine* **33**:745-64;
- Kim HJ ,Lee S, Kim TW, Kim HH, Jeon TY, Yoon YS (2008). Effects of exercise-induced weight loss on a cyclated and unacylated ghrelin in overweight children. *Clin Endocrinol(Oxf)* **68**:416-22;
- Kingwell BA (2000). Nitric oxide as metabolic regulator during exercise: effects of training in health and disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **27**: 239-250;
- Kobzik L, Reid MB, Bredt DS e Stamler JS (1994). Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* **372**: 546-548;
- Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS (1994). *Nature Lond* **372**: 546–548;
- Kobzik L, Stringer B, Balligand JC, Reid MB, Stamler JS (1995). *Biochem Biophys Res Commun* **211**: 375–381;
- Kondo H, Kodama J, Kishibe T e Itokawa Y (2003). Oxidative stress during recovery from muscle atrophy. *FEBS Lett* **326**: 89-191;
- Lambert EV, Wooding G, Lambert MI, Koeslag JH, Noakes TD (1994). Enhanced adipose tissue lipoprotein lipase activity in detrained rats: Independent of changes in food intake. *J Appl Physiol* **77**:2564-2571;
- Lambert MI, Noakes TD (1989). Dissociation of changes in VO₂max, muscle QO₂, and performance with training in rats. *J Appl Physiol* **66**:1620-1625;
- Lambert MI, Noakes TD (1990). Spontaneous running increases VO₂max and running performance in rats. *J Appl Physiol* **68**:400-403;
- Lambert MI, Van Zyl C, Jaunky R, Lambert EV, Noakes TD (1996). Tests of running performance do not predict subsequent spontaneous running in rats. *Phys & Behav* **60**:171-176;
- Lieber RL (2002). Skeletal muscle structure function and plasticity: the physiological basis of rehabilitation. Philadelphia: Lippincott; Chap. 4,5:173-285;
- Lomax RB, Robertson WR (1992). The effects of hypothyroidism and hyperthyroidism on fibre composition and mitochondrial enzyme activities in rat skeletal muscle. *J Endocrinol* **133**:375-380;

- Majano P, Lara-Pezzi E, Lopez-Cabrera M, Apolinario A, Moreno-Otero R, Garcia-Monzon C (2001). Hepatitis B virus X protein transactivates inducible nitric oxide synthase gene promoter through the proximal nuclear factor kappa B-binding site: evidence that cytoplasmic location of X protein is essential for gene transactivation. *Hepatology Dec* **34(6)**: 1218-1224.
- Malinski T, Radomski MW, Taha Z, Moncada S (1993). *Biochem Biophys Res Comm* **194**: 960-965;
- Mattiello-Sver AC, Chimelli L, Teixeira S, Pierre M, Oliveira L (2005). Effects of chronic heart disease on skeletal muscle fiber size. *Braz J Med Biol Res* **38**:303-7;
- McComas AJ (1996). Skeletal muscle: form and function. Human Kinetics;
- Mellion BT, Ignarro LJ, Ohlstein EH, Pontecorvo EG, Hyman AL, Kadowitz, PJ (1981). *Blood* **57**:946-655;
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* **43**: 109-142;
- Mungrue et al. (2002). *Heart Fail Rev Oct* **7(4)**:407-422;
- Nakane M, Schmit HH, Pollock JS, Forstermann U e Murad F (1993). Cloned human brain oxide nitric synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* **316**: 175-180;
- Pette D, Staron RS (1997). Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int Rev Cytol* **170**:143-223;
- Pette D, Staron RS (2001). Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem Cell Biol* **115**:359-72;
- Portal MND, Fonseca CLT, Oliveira ALB, Sequeiros JLS (2004). Predominância do tipo de fibra muscular e sua relação com a capacidade aeróbia de corredores de provas de fundo. *Fitness & Performance Journal* **3**: 211-217;
- Powers SK, Howley ET (2000). Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e o desempenho, São Paulo. Manole;
- Pronai L, Ichimori K, Nozaki H, Nakazawa H, Okino H, Carmichael AJ, Arroyo CM (1991). *Eur J Biochem* **202**: 923-930;
- Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S (1990). *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 5193-5197;
- Reid MB (1998). Redox mechanisms in muscle fatigue. *Pathophysiology* **5**: 113-114;

- Renart J, Reiser J, Stark GR (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci USA* **76** (7): 3116–3120;
- Rende M, Brizi E, Conner J et al. (2000). Nerve growth factor (NGF) influences differentiation and proliferation of myogenic cells in vitro via TrKA. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* **18**:869-885;
- Riede UN, Forstermann U, Drexler H e Freudenber-Plessow B (1998). Inductible nitric oxide synthase in skeletal muscle of patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* **32**: 964-969;
- Sase K, Michel T (1995). Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. *Life Sci* **57**: 2049-2055;
- Scott W, Stevens J, Binder-MacLeod SA (2001). Human skeletal muscle fiber type classifications. *Phys Ther* **81**(11):1810-1816;
- Shaul PW (2002). Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol* **64**: 749–74;
- Shen W, Hintze TH, Wolin MS (1995). *Circulation* **92**: 3505–3512;
- Stamler JS e Meissner G (2001). Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev* **81**: 209-237;
- Stamler JS, Toone EJ, Lipton SA e Sucher NJ (1997). S (NO) signals: transduction, regulation and consensus motif. *Neuron* **18**: 691-696;
- Staron RS, Kraemer WJ, Hikida RS, Reed DW, Murray JD, Campos GE et al. (1998). Comparison of soleus muscle from rats exposed to microgravity for 10 versus 14 days. *Histochem Cell Biol* **110**(1):73-80;
- Takekura H, Fujinami N, Nishizawa T, Ogasawara H, Kasuga N (2001). Eccentric exercise-induced morphological changes in the membrane systems involved in excitation-contraction coupling in rat skeletal muscle. *J Physiol* **533**:571-83;
- Tidball, JG (2005). Inflammatory processes in muscle injury and repair. *American Journal of Physiology* **288**:R345-R353;
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76** (9): 4350–4354;

- Tylor BS, Kion YM, Wang QI, Sharpio RA, Billiar TR and Geller DA (1997). Nitric oxide down regulates hepatocyte-inducible nitric oxide synthase gene expression. *Arch Surg I* **32**:1177-1182
- Vallance P, Collier J, Moncada S (1989). *The Lancet*: 997–1000;
- Van Zyl CG, Noakes TD, Lambert MI (1995). Anabolic-androgenic steroid increases running endurance in rats. *Med Sci Sports Exerc* **27**:1385-1389;
- Wernig A (2003). Regeneration capacity of skeletal muscle. *Ther Umsch* ;60:383-9;
- Yoshinobu H, Satoshi F, Sumio G, Haruzo I, Masashi Y, Hideshige M (2005). How many days per week should rats undergo running exercise to increase BMD? . *J Bone Miner Metab* **23**:289-294;

Referências a sites de internet

1. <http://emedicine.medscape.com/article/1189246-overview>, consultado em 05/07/09.
2. http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1998/index.html, em 25/06/09.